

Diversidade florística, produtividade e valor alimentar para ruminantes de pastagens naturais fertilizadas

Mariana Moniz Vaz Carreira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Agronómica

Orientadores, Professores Auxiliares: Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira

Miguel Nuno Sacramento Monteiro Bugalho

Júri:

Presidente: Doutora Maria do Rosário da Conceição Cameira, professora associada, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Cristina Saro Higuera, professora auxiliar, Universidade de Léon.
Doutor Miguel Nuno do Sacramento Monteiro Bugalho, professor auxiliar, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio incondicional dos meus orientadores, um obrigado muito especial para os professores Maria da Conceição Brálio de Brito Caldeira e Miguel Nuno Sacramento Monteiro Bugalho. Sem a vossa ajuda este trabalho era impensável. Mais uma vez muito obrigada, foi um prazer trabalhar e aprender convosco.

Agradeço à Doutora Carla Nogueira por toda ajuda em campo e durante todo o processo de análise. Um obrigado também ao Joaquim Mendes, à Paula, a todos os colaboradores do CEF por me terem recebido e ajudado de forma excecional.

Agradeço à Doutora Cristina Saro, Doutor Ivan e ao Mestre Egon Horst por toda a ajuda na CSIC-Universidade de Léon, em Espanha.

Agradeço a todos os meus colegas e amigos que me apoiaram em toda esta jornada.

Um obrigado muito especial a toda a minha família, aos meus irmãos, avós, tios, primos, por todo o apoio, carinho e amor incondicional. Em especial aos meus pais por, além de tudo, sempre apostarem na minha educação. Pai e Mãe obrigada por tudo.

À Mónica por todo o apoio, paciência, encorajamento e dedicação para comigo, um obrigado não chega.

Um obrigado a todos que por lapso não mencionei.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a reação de uma pastagem mediterrânea ao tipo de nutriente adicionado, neste caso, foi usado azoto (N), fósforo (P) e K (potássio) de forma fatorial. Essa reação foi avaliada a partir da diversidade florística e produtividade da pastagem. Este trabalho está incluído numa rede de investigação global, a “Nutrient Network” (*NutNet*, www.nutnet.org) que visa melhorar o conhecimento sobre as relações entre produtividade e diversidade florística de pastagens sob condições bióticas e abióticas variáveis. Por fim, essas características e respostas da pastagem à fertilização utilizada foram utilizadas para avaliar o seu valor alimentar para ruminantes.

Para avaliar a diversidade florística e a produtividade foram usados parâmetros como: a riqueza de espécies, pelo método de Daubenmire (1959), o índice de área foliar (IAF), a radiação fotossinteticamente ativa (RAF) e o índice de diversidade Shannon-Wiener (H). Para a análise de digestibilidade foi usado dois métodos complementares, um primeiro método com a presença de líquido ruminal onde se utilizou a fórmula de digestibilidade verdadeira *in vitro* (TIVD) (ANKOM, 2011) e um outro método sem presença de líquido ruminal, onde a biomassa (fibra) foi submetida, essencialmente, por 3 processos de lavagem: em detergente neutro (NDF), em detergente ácido (ADF) e numa solução de enxofre (H_2SO_4), onde o produto final é apenas lignina (ADL). A digestibilidade verdadeira *in vitro*, neste caso, é o inverso do valor de lignina presente no produto final, uma vez que a lignina é a parte da fibra mais indigestível para ruminantes. Estas análises foram realizadas de acordo com os métodos de van Soest *et al.* (1991) e Goering e van Soest (1970).

A compreensão destes mecanismos ajudará a antecipar os impactos das alterações globais na produtividade, composição florística e valor alimentar das pastagens, permitindo desenvolver estratégias de gestão que possam mitigar estes efeitos nas pastagens mediterrânicas.

Com base neste estudo, a adição de nutrientes levou a um aumento de biomassa e a uma diminuição na diversidade e riqueza em espécies. Este facto deve-se às gramíneas, uma vez que, demonstraram uma maior dominância com a adição de nutrientes, em relação aos outros grupos funcionais, por possuírem características bastante vantajosas, como por exemplo, maior densidade radicular, alta estrutura ou maior área foliar específica, ou seja, possuem uma forte retenção de nutrientes acima e abaixo do solo. Uma vez que, as gramíneas são caracterizadas, também, por possuírem uma parede celular com maiores teores relativos de celulose e mais baixos de lignina, podemos concluir também que, pelo método de Goering e

van Soest (1970), quanto maior a percentagem de gramíneas mais elevada é a taxa de digestibilidade verdadeira *in vitro*. De facto, neste trabalho, houve uma relação negativa entre o ADL (lignina em detergente ácido) e o número de nutrientes adicionados. Assim, sendo, a adição de 3 nutrientes poderá melhorar a qualidade da pastagem para ruminantes.

Palavras-chave: Composição florística; Fertilização; Pastagem mediterrânea; Nutrientes; Digestibilidade verdadeira *in vitro*; Método van Soest; Método Tilley e Terry.

Abstract

The objective of this work was to evaluate a mediterranean grassland reaction to the type of nutrient added, in this case, nitrogen (N), phosphorus (P) and potassium (K) were used in a factorial way. This reaction was evaluated based on floristic diversity (species richness) and grassland productivity. This work is included in a global research network, a “Nutrient Network” (NutNet, www.nutnet.org), which aims to improve knowledge about the relationships between analysis and floristic diversity of grassland under biological conditions and biological variables. Finally, these characteristics and responses from grassland to fertilization were used to assess their food value for ruminants.

To evaluate floristic diversity and productivity, were used parameters such as: species richness, by the method of Daubenmire (1959), leaf area index (IAF), photosynthetically active radiation (RAF) and Shannon-Wiener diversity index (H). For the digestibility analysis, two complementary methods were used, a first method with the presence of ruminal liquid where the true in vitro digestibility formula (TIVD) was used (ANKOM, 2011) and another method without the presence of ruminal liquid, where the biomass (fiber) was essentially submitted to 3 washing processes: in neutral detergent (NDF), in acid detergent (ADF) and in a sulfur solution (H_2SO_4), where the final product is only lignin (ADL). True in vitro digestibility, in this case, is the inverse of the value of lignin present in the final product, since lignin is the most indigestible part of the fiber for ruminants. These analyzes were performed according to the methods of van Soest *et al.* (1991) and Goering and van Soest (1970).

Understanding these mechanisms will help to anticipate the impacts of global changes in productivity, floristic composition and food value of grassland, allowing the development of management strategies that can mitigate these effects on mediterranean grasslands.

Based on this study, the graminoids showed a greater dominance with the addition of nutrients, in relation to the other functional groups, because they have quite advantageous characteristics, such as, for example, higher root density, high structure or greater specific leaf area, in other words, they have a strong retention of nutrients above and below the ground. Since, as graminoids are also characterized by having a cell wall with higher levels of cellulose and lower lignin, we can also obtain that, by the method of Goering and van Soest (1970), the higher the percentage of graminoids, higher is a true in vitro digestibility index. In fact, in this work, there was a negative relationship between ADL (acid detergent line) and the number of nutrients. So, the addition of 3 nutrients can improve the quality of pasture for ruminants.

Key words: Floristic composition; Fertilization; Mediterranean grasslands; Nutrients; True *in vitro* digestibility; van Soest method; Tilley and Terry method.

Índice

Agradecimentos	3
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Índice de tabelas	9
Índice de Figura.....	10
Lista de abreviaturas	12
Introdução	13
2. Revisão bibliográfica	15
2.1. Caracterização das pastagens mediterrâneas	15
2.2. Fertilização das pastagens	15
2.3. Valor nutritivo e digestibilidade das pastagens	17
2.3.1. Técnicas de avaliação da digestibilidade de alimentos	19
3. Materiais e métodos	21
3.1. Localização	21
3.2. Delineamento experimental	23
3.3. Métodos	26
3.3.1. Recolha de biomassa	26
3.3.2. Composição florística	27
3.3.3. Análise da digestibilidade	28
3.3.2.1. Método de <i>filter bags</i> (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY)	29
3.3.2.2. Método sem líquido ruminal	37
4. Análise estatística	39
5. Resultados	39
5.1. Efeitos da fertilização na biomassa e composição específica da pastagem.....	39
5.2. Relação da digestibilidade com as características da pastagem	45
6. Discussão.....	48
6.1. Efeitos da fertilização na biomassa e composição específica da pastagem.....	48
6.2. Fertilização e grupos funcionais	49
6.3. Fertilização e diversidade	49
6.4. Os tratamentos de fertilização e o valor nutritivo da pastagem	50
6.5. Fertilização e digestibilidade.....	50
6.6. Biomassa, composição florística e valor nutritivo da pastagem	51
7. Conclusões	52
8. Referências bibliográficas	53

Índice de tabelas

Tabela 1: Descrição das parcelas do ensaio com os respectivos tratamentos, onde: N representa o tratamento com azoto, P o tratamento com fosforo, K o tratamento com potássio, C representa a parcela controlo.	24
Tabela 2: Preparo do meio de cultura.....	33

Índice de Figura

Figura 1: A rede de investigação NutNet consiste em sítios experimentais (pontos vermelhos) distribuídos pelos seis continentes. Em Portugal localiza-se na Companhia das Lezírias, Ribatejo. Fonte: Borer et al. (2017).....	14
Figura 2: Desvios da precipitação mensal em 2019 em relação ao valor médio mensal do período 1971-2000. Fonte: IPMA.	22
Figura 3: Esquema do ensaio. A parcela está dividida em 3 blocos, sendo que cada bloco contém 15 parcelas (5 m x 5 m) que incluem todos os tratamentos; no canto superior esquerdo está indicado o número de cada parcela e no canto inferior esquerdo o tipo de tratamento: N significa um tratamento com azoto, P significa um tratamento com fósforo, K significa potássio e C significa parcelas de controlo. As parcelas A,B,C,46,47 e 48 são parcelas fora da vedação do ensaio. As parcelas D1, D2 e D3 são parcelas com tratamento de exclusão de chuva (seca) mas que não foram objeto do trabalho presente.....	25
Figura 4: Ilustração do modo de corte da biomassa com uma tira de 10 cm x 100 cm usando-se um cortador automático manual.....	26
Figura 5: Depois do processo de secagem, as amostras, foram colocadas no exsiccador (A) e, de seguida, foi feita a pesagem (B).	27
Figura 6: Quadrado 1m x 1m utilizado para a estimativa da riqueza em espécies e da cobertura de cada espécie.	28
Figura 7: Processo de trituração e moagem das amostras. A: moinho utilizado, (CYCLOTEC 1093 Sample mil); B: exemplo do material moído, neste caso, trata-se de biomassa da parcela 33.	28
Figura 8: Imagem dos 408 filter bags usados para o cálculo da digestibilidade.	30
Figura 9: Exemplo de um filter bag já numerado. Neste caso trata-se da parcela 13, do corte 1 e da réplica D.	30
Figura 10: Pesagem de cerca 0,5 gramas de amostra em cada filter bag correspondente. ...	31
Figura 11: Processo de selagem de cada filter bag.	31
Figura 12: Exemplo de um dos frascos de digestão do aparelho Daisy ^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY).	32
Figura 13: Equipamento Daisy ^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY) utilizado para simular o processo de fermentação ruminal.	32
Figura 14: A: Meio de cultura já preparado; B: Fornecimento de CO ₂	33
Figura 15: Exemplo de uma das quatro ovelhas, fistuladas da raça ASSAF, utilizadas para obter o líquido ruminal; Situadas e tratadas pelo Instituto de Ganadería de Montaña, em León, Espanha.	34
Figura 16: Filter bags depois da retirados dos frascos de digestão, prontos para o processo de secagem.....	35
Figura 17: Filter bags, depois da secagem, lavados no ANKOM 200 Fiber Analyzer com detergente neutro.	35
Figura 18: Filter bags em acetona para acelerar o processo de secagem.	36
Figura 19: Exemplo de identificação dos filter bags para este procedimento; neste caso, trata-se das réplicas da parcela 35 tanto no corte 1 como no corte 2.	37
Figura 20: A: Solução de enxofre (H ₂ SO ₄) no lado esquerdo da Figura; B: Filter bags em contacto com a solução de enxofre (H ₂ SO ₄).....	38
Figura 21: Exemplo de um filter bag após todos os processos, ou seja, o que ficou de lignina desta amostra.	38

Figura 22: Resposta da biomassa (média±erro padrão) da pastagem (g.m^{-2}) ao número de nutrientes adicionados.....	40
Figura 23: Gráfico de barras que relaciona a biomassa (g.m^{-2}) (média±erro padrão) com o tipo de nutrientes adicionados.....	40
Figura 24: Gráfico de barras sobre a composição de espécies que relaciona a percentagem de grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras espécies) com o número de nutrientes adicionados.	41
Figura 25: Gráfico de barras que relaciona a percentagem de grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras espécies) com o/os tipo/os de fertilização utilizado/os.	42
Figura 26: Gráfico de barras que relaciona o número de espécies (média± erro padrão) com o número de nutrientes adicionados.....	42
Figura 27: Gráfico de barras que relaciona a riqueza de espécies (média±erro padrão) consoante o/os nutriente/es adicionado/os.....	43
Figura 28: Gráfico de barras que representa o índice de Shannon-Wiener (média ± erro padrão) de acordo com o número de nutrientes adicionados.	44

Lista de abreviaturas

N	Azoto
P	Fósforo
K	Potássio
NDF	Fibra em detergente neutro
ADF	Fibra em detergente ácido
ADL	Lignina em detergente ácido
MS	Matéria seca
IAF	Índice área foliar
RAF	Radiação fotossinteticamente ativa
TIVD	Digestibilidade verdadeira <i>in vitro</i>

Introdução

O aumento dos níveis globais de nutrientes, devido a atividades humanas e o efeito deste aumento nos ecossistemas enquadra-se no desafio das alterações globais (Phoenix *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2009). A queima de combustíveis fósseis e a fertilização, dobraram e quintuplicaram, respetivamente, os reservatórios globais de azoto (N) e fósforo (P) em relação aos níveis pré-industriais (Galloway *et al.*, 2004; Peñuelas *et al.*, 2012). Estas mudanças podem alterar a disponibilidade destes recursos para as plantas, com efeitos na biodiversidade e o funcionamento de diversos ecossistemas, incluindo as pastagens (Fay *et al.*, 2000). Assim, aos conhecidos efeitos das alterações climáticas (por exemplo, secas extremas) na estrutura e produtividade das pastagens (Giorgi, 2006), também este aumento de disponibilidade em nutrientes pode originar alterações na produtividade e composição florística (Peco *et al.*, 1998; Zavaleta *et al.*, 2003; Miranda *et al.*, 2009), que por sua vez, poderão afetar o valor alimentar das pastagens para a produção animal.

O objetivo principal deste trabalho, é avaliar os efeitos do aumento da disponibilidade em nutrientes na estrutura e funcionamento de uma pastagem mediterrânica. Mais especificamente, pretende-se responder às seguintes questões: Qual é o efeito do aumento da disponibilidade em nutrientes na 1) na produtividade, 2) na diversidade específica e funcional da pastagem (por exemplo, abundância de leguminosas) e 3) no valor alimentar da pastagem para ruminantes? Pretende-se ainda determinar se algum dos nutrientes adicionados, como o N, terá um papel mais relevante que os outros na determinação da composição florística e no valor alimentar da pastagem.

A compreensão destes mecanismos ajudará a antecipar os impactos das alterações globais na produtividade, composição florística e valor alimentar das pastagens, permitindo desenvolver estratégias de gestão que possam mitigar estes efeitos nas pastagens mediterrânicas. Além disso, poderá permitir compreender como é que a gestão de pastagens através da fertilização, poderá melhorar o seu valor nutritivo para os ruminantes. Esta avaliação tem também uma importância económica e social, uma vez que permite otimizar o desempenho animal, minimizando os custos de produção, reduzindo, simultaneamente, os impactos sobre o ambiente.

Os dados recolhidos e analisados neste trabalho resultam de uma rede de investigação global, a “Nutrient Network” (*NutNet*, www.nutnet.org) que visa melhorar o conhecimento sobre as relações entre produtividade e diversidade florística de pastagens sob condições bióticas e abióticas variáveis a nível global. A rede de investigação *NutNet* é composta por mais de 100 pastagens experimentais distribuídas por países (incluindo Portugal) em todos os continentes

(Figura 1), sendo o delineamento experimental e o protocolo de recolha de dados base (biomassa vegetal e composição específica de cada pastagem) semelhante para todos os países.

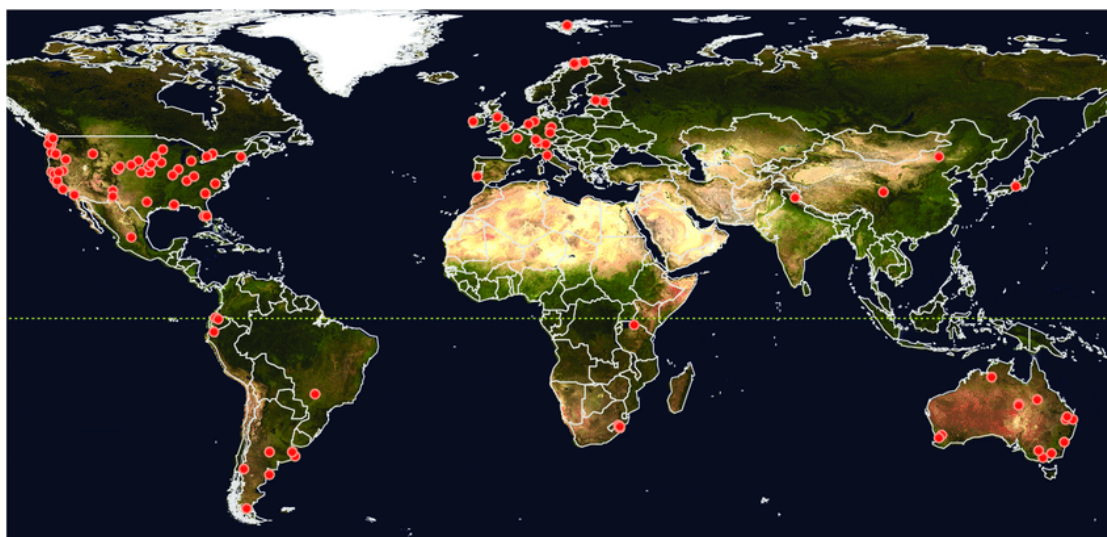


Figura 1: A rede de investigação NutNet consiste em sítios experimentais (pontos vermelhos) distribuídos pelos seis continentes. Em Portugal localiza-se na Companhia das Lezírias, Ribatejo. Fonte: Borer et al. (2017).

2. Revisão bibliográfica

2.1. Caracterização das pastagens mediterrâneas

As pastagens podem ser definidas como “terras cobertas de plantas herbáceas com menos de 10% de cobertura de árvores e arbustos” (UNESCO, 1973). As pastagens ocupam aproximadamente 40% da área terrestre do planeta e encontram-se, mais frequentemente, em zonas semiáridas (28% das pradarias do mundo), zonas húmidas (23%), frias (20%) e áridas (19%) (White *et al.*, 2000). As pastagens mediterrânicas, naturais e seminaturais, são uma importante fonte de alimento para animais, e desempenham um papel fundamental, na conservação da biodiversidade, no balanço de carbono e reciclagem de nutrientes (Bugalho e Abreu, 2008). As alterações globais, nomeadamente o aumento da deposição atmosférica de N e P, afetam potencialmente a ecologia e funcionamento destas pastagens.

Nas pastagens mediterrânicas, caracterizadas por uma diversidade elevada de espécies anuais (Pitt e Heady, 1978; Díaz-Villa *et al.*, 2003), a produtividade primária e a composição em espécies estão diretamente relacionadas com a sazonalidade, frequência e quantidade de precipitação (Espigares e Peco, 1993, 1995). Existindo água disponível no solo, o crescimento e fenologia das plantas depende de temperaturas ótimas acumuladas (Peñuela e Filella, 2001). A típica variabilidade da precipitação, anual e interanual, do clima mediterrânico (Lázaro *et al.*, 2001) assim como a, cada vez mais frequente, ocorrência de secas, podem afetar a produtividade e as espécies dominantes nas pastagens, assim como a sua diversidade funcional (Pérez-Camacho *et al.*, 2012; Carmona *et al.*, 2015; Rota *et al.*, 2017). Por exemplo, a seca pode aumentar a abundância de espécies de pequeno porte, espécies com baixa área foliar específica (área foliar por peso seco) e espécies com alto teor de matéria seca foliar (Westoby *et al.* 2002). No entanto, a produtividade das pastagens é também colimitada pela disponibilidade de nutrientes, como o N (Hooper e Johnson, 1999; Báez *et al.*, 2007; Harpole *et al.*, 2007).

2.2. Fertilização das pastagens

A produtividade primária terrestre é limitada pela disponibilidade em nutrientes (Chapin *et al.*, 2011). A maior parte dos trabalhos de investigação têm-se focado na limitação da produtividade primária apenas por um único nutriente, o N (Vitousek *et al.*, 1991; LeBauer *et al.*, 2008). Nas pastagens e em outros ecossistemas, o papel de outros nutrientes além do N é no entanto cada vez mais reconhecido. Recentes estudos de fertilização com N e P

evidenciaram a limitação da produtividade terrestre tanto por N quanto por P. Frequentemente, estes nutrientes são também colimitantes, isto é, em simultâneo P e N limitam a produtividade mais do que a soma de suas limitações individuais (Carnicer *et al.*, 2015). No entanto, a extensão global e a magnitude da limitação múltipla por outros nutrientes diferentes de N e P (Fisher *et al.*, 2012; Hooper e Johnson, 1999) permanece pouco compreendida em sistemas naturais, incluindo pastagens, um bioma criticamente ameaçado, e que corresponde aproximadamente a um terço da produção primária da rede terrestre (Hoekstra *et al.*, 2005).

As atividades antropogénicas, nomeadamente, o aumento do uso de fertilizantes nas pastagens, especificamente N e P, juntamente com o N resultante da queima de combustíveis têm aumentado a disponibilidade de nutrientes na biosfera (Peñuelas *et al.*, 2013). Além disso, o N produzido é cada vez mais reativo do que o produzido a partir de todas as fontes terrestres naturais (Galloway *et al.*, 2003; Rockstrom *et al.*, 2009). Estes aumentos antropogénicos de N atmosférico resultam na deposição posterior de N nos ecossistemas, alterando o seu funcionamento (Galloway *et al.*, 2003; Phoenix *et al.*, 2012) e potencialmente aumentando a limitação por outros nutrientes, tais como P, potássio (K) ou oligoelementos (por exemplo, o ferro) (Mahowald *et al.* 2008).

Relativamente às pastagens mediterrâneas há pouca informação sobre o efeito deste aumento da disponibilidade de nutrientes nestes ecossistemas. Mesmo em relação ao N, o nutriente mais estudado, há uma escassez de dados sobre os efeitos da deposição de azoto, principalmente nos níveis previstos de aumento para a região do Mediterrâneo, sobre a ecologia das pastagens mediterrâneas (Ochoa-Hueso *et al.*, 2011).

Segundo alguns estudos, a adição de N não aumenta a produtividade nem altera a composição ou fenologia das espécies da pastagem. Muitos estudos evidenciaram uma relação positiva entre a adição de N e a produtividade das plantas e uma relação negativa entre a adição de N e a riqueza de espécies (por exemplo, Zavaleta *et al.*, 2003; Suding *et al.*, 2005; Clark *et al.*, 2007). A variabilidade nos resultados obtidos em muitos destes estudos pode ter resultado de diferentes taxas de adição de N e de outras condições contextuais (por exemplo, ano seco) (Cleland e Harpole, 2010; Ochoa-Hueso *et al.*, 2011).

Além disso, a maioria das pesquisas sobre os impactos da deposição de N em ecossistemas do Mediterrâneo foi realizada na Califórnia, EUA, com menos foco na bacia do Mediterrâneo (Bobbink *et al.*, 2010; Ochoa-Hueso *et al.*, 2011, 2013). Alguns desses últimos estudos mostraram, como resultado da adição de N, o aumento da produtividade e ausência de efeitos,

ou diminuição da riqueza de espécies nas pastagens investigadas (Bonanomi *et al.*, 2006, 2013).

No entanto, riqueza e diversidade, por si só, podem não refletir o papel das espécies no funcionamento dos ecossistemas, nomeadamente na produtividade primária (por exemplo, Tilman *et al.*, 1997; Cadotte *et al.*, 2011; Mouillot *et al.*, 2011). É também necessário avaliar as respostas dos ecossistemas às mudanças ambientais através das características funcionais das plantas (por exemplo, Díaz *et al.*, 2007; Mouillot *et al.*, 2011). Características funcionais referem-se a parâmetros morfológicos, fisiológicos ou fenológicos que podem ser medidas ao nível individual (Díaz e Cabido, 2001). As características funcionais determinam o papel das espécies nos ecossistemas e/ou sua resposta às mudanças das condições ambientais ou perturbações (Díaz e Cabido, 2001). Em muitos trabalhos, agregam-se as espécies vegetais por grupos funcionais, nomeadamente gramíneas, leguminosas e outras (por exemplo, Harpole *et al.* 2007, Nogueira *et al.* 2018). Num trabalho recente numa pastagem natural fertilizada (Nogueira *et al.*, 2018) verificou-se que a adição de N,P,K favoreceu, em geral, o desenvolvimento de espécies competidoras por recursos, principalmente gramíneas. As gramíneas apresentaram, em média, uma área foliar específica e altura máxima maiores comparativamente a outras espécies presentes na pastagem. No entanto, segundo Nogueira *et al.* 2018, verificou-se também que a interação da adição de nutrientes e do ano climatológico afetou a proporção de gramíneas e dos grupos funcionais de outras espécies, e que a proporção de leguminosas não foi afetada pelo número de nutrientes, mas que a adição de N e a seca tiveram um efeito negativo na produtividade das leguminosas.

2.3. Valor nutritivo e digestibilidade das pastagens

Sistemas baseados em pastagens e forragens são a base da produção animal permitindo que animais como os ruminantes produzam proteínas de alta qualidade para consumo humano e outros produtos (por exemplo lã, peles). No âmbito da “intensificação sustentável”, que visa aumentar a produção agrícola e o rendimento não colocando em risco a sustentabilidade dos ecossistemas, a investigação procura encontrar maneiras de obter rendimentos mais altos sem aumentar o uso de fertilizantes minerais (Royal Society, 2009). A inclusão de leguminosas nas pastagens e outras culturas agrícolas, pode ajudar a atingir esse objetivo (Canfield *et al.*, 2010), uma vez que o N é um fator muito limitante para o crescimento das plantas em várias regiões do mundo. A inclusão de leguminosas nas culturas e a consequente fixação do N atmosférico, além de diminuir a dependência das culturas da energia fóssil e

fertilização industrial de N, tem outros benefícios como, por exemplo, a diminuição de quantidades de emissões nocivas para o ambiente (por exemplo, gases com efeito de estufa), menores custos de produção, maior produtividade, aumento da autossuficiência proteica e opções de adaptação ao aumento de concentrações de CO² atmosférico e mudanças climáticas (Lüscher *et al.* 2014).

Para além de potenciais benefícios de rendimento, a inclusão de leguminosas nas culturas, incluindo pastagens e forragens, pode melhorar a digestibilidade e qualidade da forragem para alimentação animal. Em animais ruminantes, a ingestão de pastagens relaciona-se com digestibilidade da matéria seca, conteúdo estrutural de hidratos de carbono e capacidade de decomposição do material vegetal no rúmen (Armstrong *et al.*, 1986). As leguminosas são geralmente ingeridas em maior quantidade do que as de gramíneas, pois são degradadas mais rapidamente (isto é, têm maior digestibilidade) pelos ruminantes do que as gramíneas (Rook e Yarrow, 2002). As interações entre gramíneas e leguminosas, no entanto, têm originado resultados contraditórios na digestibilidade e frequentemente dependentes de outras espécies associadas que são ingeridas (por exemplo, Hunt *et al.*, 1985; Reid *et al.*, 1987).

Segundo Mott (1970), o conceito de valor nutritivo refere-se à composição química da forragem e à sua digestibilidade. Em contrapartida, a qualidade de uma planta forrageira é representada pela associação da composição bromatológica, da digestibilidade e do consumo voluntário, entre outros fatores, que caracterizam a forragem em questão. Entre as plantas que acumulam a maior quantidade de proteína estão as leguminosas (Chrenková *et al.*, 2011), que estabelecem simbioses com bactérias (por exemplo, *Rhizobium leguminosarum*) que fixam o azoto de origem atmosférica e, por esse motivo, não requerem fertilização intensiva com azoto (El Fiel *et al.*, 2002).

Para além do valor nutritivo das pastagens depender da sua composição florística é importante que os níveis de produtividade se mantenham constantes ao longo do tempo, isto é, que as pastagens tenham estabilidade. Sabe-se que o aumento da diversidade de espécies vegetais implica maior estabilidade na produtividade de pastagens naturais ou seminaturais (Tilman, 1996). Adicionalmente, o valor nutritivo pode potencialmente aumentar com uma maior diversidade de espécies, devido a diferenças inerentes à composição química e diferentes estágios de maturidade das espécies vegetais numa comunidade diversa de plantas (Bruinenberg *et al.*, 2002; Huyghe *et al.*, 2008). Por exemplo, o valor nutritivo da pastagem pode depender das espécies dominantes que, ao se estabelecerem e dominarem a comunidade podem alterar a composição botânica e induzir diferenças na composição

química e digestibilidade da pastagem (Duru *et al.*, 2008). Outros trabalhos mostraram que diferenças no valor nutritivo das pastagens parecem estar mais estreitamente relacionadas com as diferenças nas proporções relativas dos vários grupos funcionais de plantas (Sanderson, 2010; Deak *et al.*, 2007).

O grupo dos herbívoros ruminantes é um dos mais importantes na produção animal. Devido às características do aparelho digestivo este grupo animal é extremamente eficiente na degradação e aproveitamento da parede celular das plantas por fermentação. A fermentação ocorre no rúmen onde uma multiplicidade de organismos e enzimas realizam a digestão ruminal das paredes celulares (Weimer, 1993) e outros constituintes das plantas como o amido e outros hidratos de carbono não estruturais (McAllister *et al.*, 1993). A degradação de proteínas no rúmen também depende dos numerosos micro-organismos simbiontes que degradam proteínas, peptídeos e aminoácidos (Jouany, 1996; Wallace, 1996; Cotta, 1988; Attwood e Reilly, 1995). A digestibilidade do alimento refere-se assim à proporção de um componente nutricional que foi absorvido pelo organismo animal.

2.3.1. Técnicas de avaliação da digestibilidade de alimentos

O conhecimento da digestibilidade dos alimentos é importante para definir a qualidade da dieta, uma vez que esse fator determina a quantidade de nutrientes que serão efetivamente aproveitados pelo animal. A quantidade total de nutrientes absorvidos na dieta é um dos fatores que mais vão exercer influência na resposta do animal em produção (Berchielli *et al.* 2005). Existem diferentes técnicas de avaliação da digestibilidade de alimentos, nomeadamente técnicas *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

O método *in vivo* para avaliação da digestibilidade é o mais preciso de todos, uma vez que, é realizado no próprio animal. No entanto esse método é muito mais dispendioso, pois exige uma grande quantidade de animais e de alimentos. Além de ser mais demoroso, esta técnica também gera um grande volume de amostras para análise (alimento, fezes e urina). Por isso, muitas vezes não é utilizada principalmente quando se pretende avaliar mais do que um tipo de alimento (Senger *et al.*, 2007). Por essa razão, foram desenvolvidas as técnicas de digestibilidade *in vitro* e *in situ*, como métodos alternativos para se determinar a digestibilidade dos alimentos de forma mais rápida e permitindo a utilização de uma menor quantidade de alimentos, bem como a avaliação de vários alimentos diferentes ao mesmo tempo. Estas técnicas representam modelos biológicos que simulam os processos de digestão *in vivo* com diferentes níveis de complexidade (Puente, 2005).

A técnica de digestibilidade *in situ*, consiste na avaliação da degradação de alimentos incubados em sacos de náilon. Estes sacos são mantidos dentro do rúmen de animais fistulados sendo removidos em intervalos de tempo determinados (Orskov e McDonald 1979). Esta técnica apresenta como limitação a falta de padronização, por esse motivo são detetadas diferenças nos resultados entre os laboratórios, mesmo quando utilizam condições de avaliação idênticas (Nocek, 1985).

A técnica de digestibilidade *in vitro* é muito comum na avaliação de alimentos para ruminantes por apresentar resultados de forma rápida, menos invasiva e fortemente correlacionados com os resultados obtidos *in vivo* (Velásquez *et al.*, 2010). Para além da rapidez na obtenção de resultados, é possível trabalhar e avaliar um elevado número de tratamentos e baixas quantidades de amostra (Araújo, 2010). Alguns autores consideram este procedimento mais prático e preciso, visto que quase todo o processo é desenvolvido em laboratório simulando as condições naturais da digestão (por exemplo, Alcalde, 2001). As medidas da digestibilidade *in vitro* da matéria seca (isto é, da amostra da planta seca em estufa) e digestibilidade da matéria orgânica têm sido amplamente utilizadas para avaliar a digestibilidade dos alimentos (Altangerel *et al.*, 2011; Xia *et al.*, 2012). Por isso, a técnica de digestibilidade *in vitro* tem sido utilizada com objetivo de estimar a digestibilidade *in vivo* dos alimentos (Menke e Steingass, 1988), bem como avaliá-los comparativamente (Silva *et al.*, 2017).

A maioria destas técnicas sofreram alterações e foram adaptadas ao longo do tempo conforme as necessidades e os resultados de investigação. Por exemplo, o método convencional de Baumgardt *et al.* (1962) consistia em incubar durante 24 horas as amostras em inóculo ruminal, foi posteriormente modificado por Tilley e Terry (1963) para melhor simular a digestão do alimento vegetal no rúmen. Mais tarde, van Soest (1967), sugeriu que a técnica de determinação de fibra insolúvel em detergente neutro em plantas forrageiras é a melhor estimativa de qualidade alimentar do alimento vegetal. Segundo van Soest (1967), a fibra pode ser quantitativamente e especificamente separada dos outros componentes do alimento (proteínas, amido e lipídios) por ebulição com solução detergente em pH neutro. As fibras insolúveis (celulose, a maior parte das hemiceluloses e lignina) são separadas por filtração e as fibras solúveis em água (pectinas, gomas, mucilagens e algumas hemiceluloses) são perdidas durante o processamento e descartadas.

Por isso, o método de Tilley e Terry (1963) foi também melhorado por Goering e van Soest (1970) que propuseram um passo envolvendo tratamento da amostra com detergente neutro do resíduo. A extração com o detergente neutro remove as paredes celulares de bactérias e produtos endógenos, além de proteínas e, portanto, esta modificação permite prever a

digestibilidade verdadeira, isto é, o valor de digestibilidade da planta *per se*, em vez da digestibilidade aparente que inclui, além da planta, resíduos animais microbianos (proteína). Esta modificação permitiu manter a precisão das análises, requerendo aproximadamente metade do tempo despendido por exemplo no método de Tilley e Terry (1963), permitindo ainda a análise a larga escala de números elevados de amostras (Silva e Queiroz, 2002).

Ainda hoje (por exemplo, Ruiz *et al.*, 2019; Anjos *et al.*, 2020) a técnica de Goering e van Soest (1970) é, cada vez mais, a base de várias abordagens para estimar a digestibilidade ruminal e do trato total, incluindo a aplicação em programas de avaliação de forragem (por exemplo, Holt *et al.*, 1978). Neste método, a extensão da digestão da fibra em detergente neutro (NDF) é determinada após uma incubação de 48 horas com inóculo ruminal. Supõe-se que os solúveis em detergente neutro tenham uma digestibilidade constante e elevada *in vivo* (cerca de 98%).

Recentemente uma alternativa promissora é a técnica *in vitro* usando sacos de filtro (*filter bags*) (por exemplo, Genç *et al.*, 2020). Pequenas quantidades de amostras são pesadas em sacos de filtro, que são inoculados dentro de um recipiente de fermentação em incubadoras rotativas, permitindo a análise de um grande número de amostras de uma só vez. Permitindo, assim, a determinação de MS, NDF e fibra em detergente ácido (ADF) pelo resíduo contido nos *filter bags* (López, 2005). O sistema permite investigar os efeitos de mudanças no ambiente ruminal sobre a digestibilidade dos alimentos, por exemplo com a variação ou alteração de uma determinada substância (como é o caso dos nutrientes).

3. Materiais e métodos

3.1. Localização

A área de estudo localiza-se na Companhia das Lezírias, uma propriedade agroflorestal localizada a nordeste de Lisboa, Portugal (38°49'45,13''N, 8°47'28,61''W) onde ocorrem vários tipos de uso da terra incluindo pastagens seminaturais. O trabalho de campo foi realizado numa pastagem experimental estabelecida na Companhia das Lezírias no âmbito da rede de investigação global, "Nutrient Network" (*NutNet*, www.nutnet.org). Esta rede de investigação, constituída por pastagens experimentais em vários continentes, visa investigar os efeitos da fertilização na produtividade e diversidade florística das pastagens. Todos os sítios usam o mesmo protocolo de investigação e recolha de dados, tal como descrito abaixo.

A pastagem experimental da Companhia das Lezírias, de tipo mediterrânico, é composta sobretudo por espécies anuais, que emergem depois das primeiras chuvas de outono. Entre

as espécies mais comuns encontram-se a *Tolpis barbata* L., *Plantago bellardii* All. e *Tuberaria guttata* (L.) Fourr., gramíneas como por exemplo *Agrostis pourretii* Willd., *Avena barbata* Link e *Gaudinia fragilis* (L.) P.Beauv., e leguminosas como o *Ornithopus compressus* L., *Trifolium arvense* L. ou *Trifolium campestre* Schreb.

O clima na área de estudo é um clima mediterrânico temperado, segundo a classificação de Köppen (1900), caracterizado por invernos suaves e húmidos e verões quentes e secos. A primavera é tardia e as secas de verão ocorrem entre maio e outubro e as chuvas de inverno entre novembro e abril. A precipitação média anual (média de 1961–1990) é de 709 mm, e a temperatura média anual de 15,9 °C, variando de 10 °C em janeiro a 22,5 °C em agosto (INMG, 1991). De acordo com o Instituto Português do Mar e da Atmosfera (IPMA), o valor médio anual da temperatura média do ar em 2019 foi de 15.58 °C. Ainda de acordo com o IPMA, no ano de 2019 o valor médio de precipitação total anual foi de 755.6 mm, o que corresponde a cerca de 86% do valor normal (Figura 2). A topografia na área de estudo é predominantemente plana, dominando os solos do tipo Arenosolo Haplic profundo bem drenado (IUSS, 2006) com baixa capacidade de retenção de água e teor de N (0,12%).

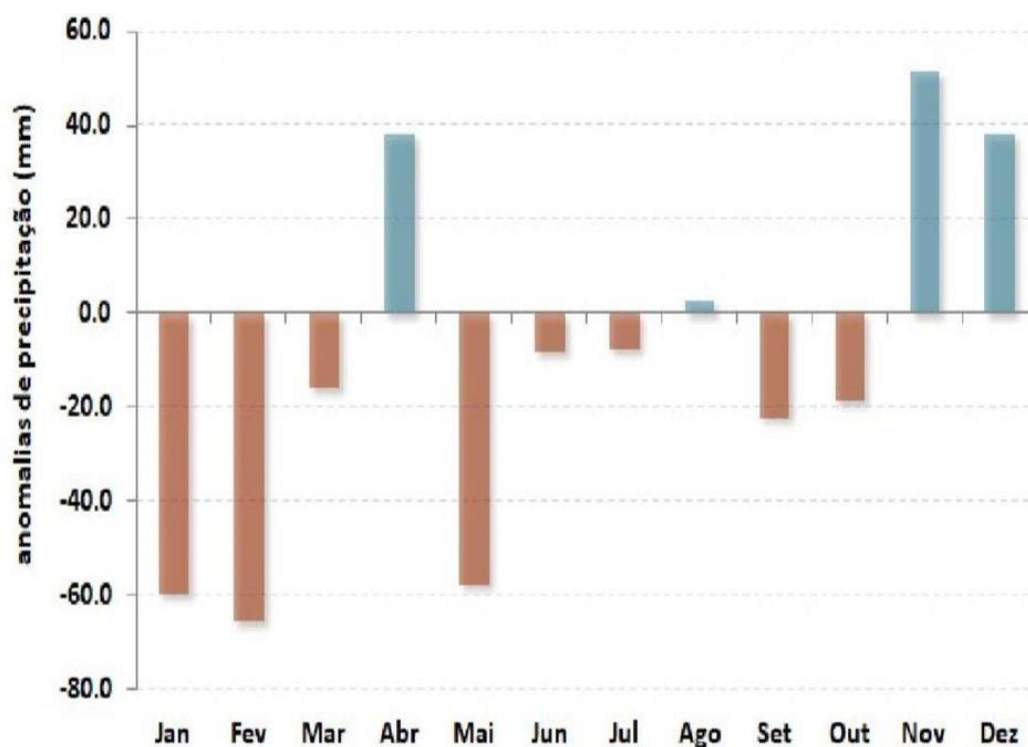


Figura 2: Desvios da precipitação mensal em 2019 em relação ao valor médio mensal do período 1971-2000. Fonte: IPMA.

3.2. Delineamento experimental

Em 2012, foram instaladas 45 parcelas de 5 m x 5 m, todas separadas por um corredor de 1 m, e estabelecidas em 3 blocos com 15 parcelas por bloco (Figura 2). O tratamento de fertilização consistiu na adição de N, P, K e micronutrientes, feito de forma fatorial, totalizando oito adições diferentes de nutrientes por bloco, incluindo também parcelas controle (sem adição de nutrientes). Relativamente às concentrações de macronutrientes: N foi adicionado com uma taxa de $10 \text{ g.m}^{-2}.\text{ano}^{-1}$, P e K foram adicionados como tri-superfosfato e sulfato de potássio, respetivamente, ambos a taxas de $10 \text{ g.m}^{-2}.\text{ano}^{-1}$ (Figura 2).

Estabeleceu-se um gradiente de adição de nutrientes (por exemplo, Harpole *et al.*, 2016) com 4 tratamentos: adição de 0,1,2 e 3 macronutrientes em que as parcelas controle não são fertilizadas. O tratamento “adição de 1 macronutriente” corresponde a parcelas com uma adição única de N, P ou K; o tratamento “adição de 2 macronutrientes” corresponde a parcelas com NP, NK ou PK, e o tratamento “adição de 3 macronutrientes” corresponde a parcelas fertilizadas com NPK. Relativamente ao número de réplicas por tratamento estas foram as seguintes (Tabela 1). Fertilização com:

- 1 macronutriente: 15 réplicas;
- 2 macronutrientes: 9 réplicas;
- 3 macronutrientes: 12 réplicas.

Tabela 1: Descrição das parcelas do ensaio com os respectivos tratamentos, onde: N representa o tratamento com azoto, P o tratamento com fosforo, K o tratamento com potássio, C representa a parcela controlo.

Bloco	Parcela	Tratamento	Nº de nutrientes
1	1	PK	2
1	2	K	1
1	3	NPK	3
1	4	C	0
1	5	C	0
1	6	NK	2
1	7	Não utilizada	
1	8	P	1
1	9	NP	2
1	10	NPK	3
1	11	N	1
1	12	Não utilizada	
2	13	C	0
2	14	Não utilizada	
2	15	NK	2
2	16	NPK	3
2	17	NP	2
2	18	NPK	3
2	19	C	0
2	20	P	1
2	21	N	2
2	22	Não utilizada	
2	23	K	1
2	24	PK	2
3	25	P	1
3	26	Não utilizada	

Bloco	Parcela	Tratamento	Nº de nutriente
3	27	Não utilizada	
3	28	NPK	3
3	29	NPK	3
3	30	N	1
3	31	NP	2
3	32	PK	2
3	33	C	0
3	34	C	0
3	35	NK	2
3	36	K	1
1	40	P	1
1	41	N	1
2	42	N	1
2	43	P	1
3	44	N	1
3	45	P	1

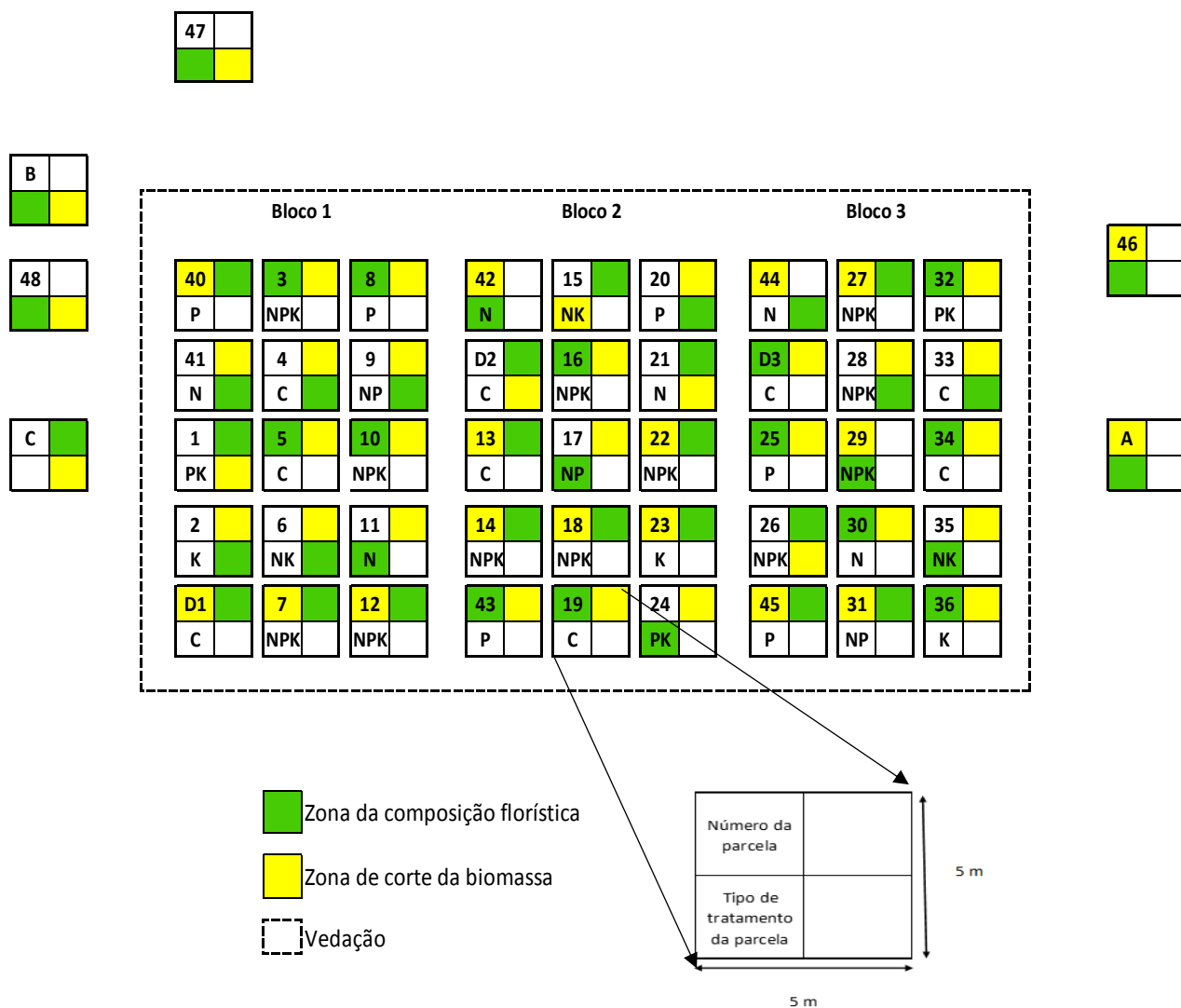


Figura 3: Esquema do ensaio. A parcela está dividida em 3 blocos, sendo que cada bloco contém 15 parcelas (5 m x 5 m) que incluem todos os tratamentos; no canto superior esquerdo está indicado o número de cada parcela e no canto inferior esquerdo o tipo de tratamento: N significa um tratamento com azoto, P significa um tratamento com fósforo, K significa potássio e C significa parcelas de controlo. As parcelas A,B,C,46,47 e 48 são parcelas fora da vedação do ensaio. As parcelas D1, D2 e D3 são parcelas com tratamento de exclusão de chuva (seca) mas que não foram objeto do trabalho presente.

O local do ensaio foi também vedado no início da experiência, em 2012, para evitar a entrada de gado.

3.3. Métodos

3.3.1. Recolha de biomassa

A biomassa de plantas cortada junto ao solo foi usada como indicador da produtividade das pastagens. A produtividade foi por isso estimada, destrutivamente, em maio de 2019, através do corte da vegetação 5 cm acima do solo. O corte de biomassa em cada uma das parcelas foi feito em três retângulos de amostragem de 10 cm x 100 cm (Figura 4), cortando-se por isso três amostras de biomassa por parcela. Duas destas amostras foram usadas para estimativa da biomassa vegetal (produtividade primária) total e por grupo funcional (gramíneas, leguminosas e outras) e ainda quantidade de biomassa verde e biomassa seca por grupo funcional. A terceira amostra foi utilizada para a análise da digestibilidade.



Figura 4: Ilustração do modo de corte da biomassa com uma tira de 10 cm x 100 cm usando-se um cortador automático manual

A separação das amostras de biomassa por grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras) e em material seco ou verde foi feita em laboratório. Para isso, a biomassa foi seca em estufa durante 48 horas à temperatura de 65°C até se obter um peso constante da amostra (Figura 5).

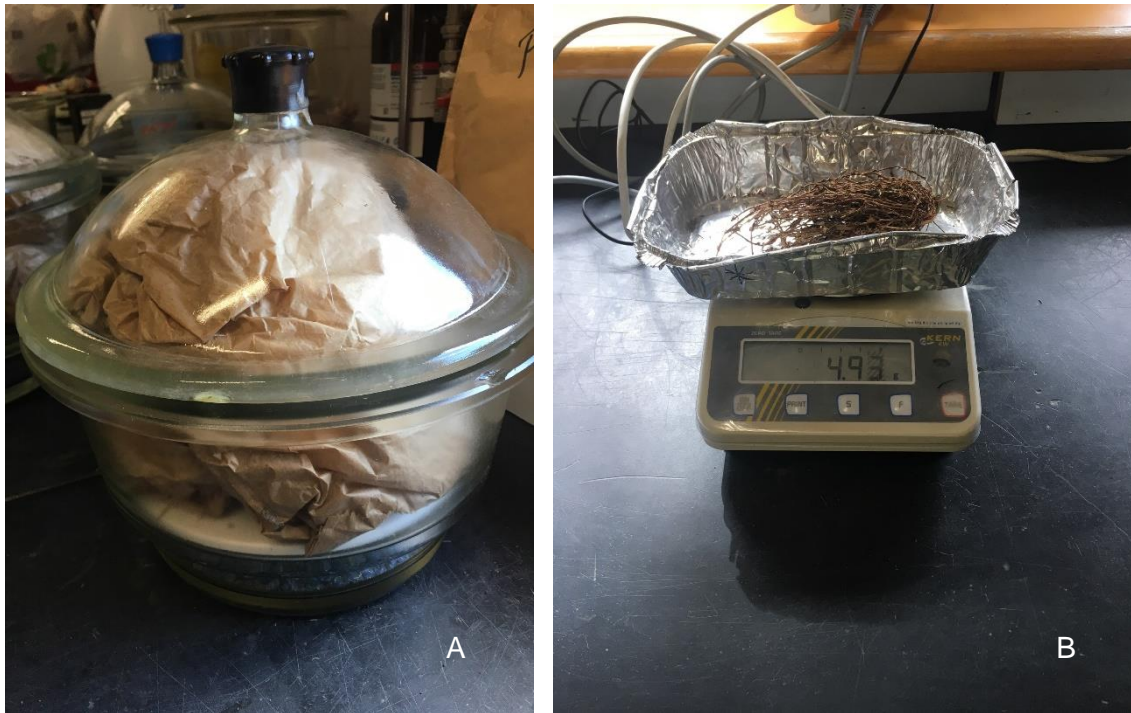


Figura 5: Depois do processo de secagem, as amostras, foram colocadas no exsiccador (A) e, de seguida, foi feita a pesagem (B).

A biomassa total e por grupo funcional (gramíneas, leguminosas e outras) foi estimada por unidade de área em g/m².

3.3.2. Composição florística

Em maio, foi feita uma estimativa da riqueza em espécies e da cobertura de cada espécie por parcela usando um quadrado de 1 m x 1 m, e o método de Daubenmire (1959) (Figura 6). A cobertura (%) de cada espécie foi estimada visualmente, para o 1% mais próximo. A riqueza de espécies foi calculada como o número de espécies de plantas por parcela.



Figura 6: Quadrado 1m x 1m utilizado para a estimativa da riqueza em espécies e da cobertura de cada espécie.

3.3.3. Análise da digestibilidade

Foi feita a trituração e moagem das amostras de cada parcela, depois de secas em estufa a 65°C até peso constante. Triturou-se cerca de 10 gramas de material até uma dimensão de cerca de 1 mm que é o tamanho médio das partículas vegetais no interior do rúmen do animal (Figura 7).



Figura 7: Processo de trituração e moagem das amostras. A: moinho utilizado, (CYCLOTEC 1093 Sample mil); B: exemplo do material moído, neste caso, trata-se de biomassa da parcela 33.

A análise de digestibilidade foi realizada usando os métodos de Tilley e Terry (1963) e de Goering e van Soest (1970). Nesta análise, foi simulada a digestão no rúmen dos animais para se estimar o valor nutritivo da pastagem quando sujeita aos diversos tratamentos de fertilização. Usaram-se dois métodos independentes para a estimativa da digestibilidade: 1) digestibilidade *in vitro* com líquido ruminal (método de *filter bags* (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY)); 2) digestibilidade estimada sem líquido ruminal (adição de detergente neutro e ácido segundo o método de van Soest 1970). A análise de digestibilidade foi realizada pela autora da tese no laboratório da CSIC-Universidade de León, em Espanha, em parceria com o Instituto de Ganadería de Montaña, entre os dias 8 de junho de 2019 e 9 de julho de 2019.

3.3.2.1. Método de *filter bags* (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY)

O método dos *filter bags* foi realizado num fermentador ruminal, ou incubadora, DAISY^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY). Este método, baseia-se na inoculação de substratos vegetais armazenados em *filter bags*, possibilitando avaliar uma grande quantidade de amostras simultaneamente. A incubadora DAISY^{II} foi desenvolvida para melhorar a eficiência laboratorial da técnica *in vitro*, simulando a fermentação ruminal (Alcade *et al.*, 2001). Este fermentador possui quatro frascos de digestão independentes, mantendo-se o meio de fermentação em agitação contínua e a uma temperatura constante de 39,5°C (Araújo, 2010). Este fermentador permite incubar diferentes alimentos em *filter bags*, no mesmo frasco, considerando-se como digerido o material que desaparece dos sacos (Mabjeesh *et al.*, 2000) e como não digerido o material remanescente que permanece nos sacos. O fermentador DAISY^{II} pode ser utilizado para estimativa de digestibilidade *in vitro* de forragens ou grãos (Holden, 1999). O procedimento utilizado para realizar a análise da digestibilidade verdadeira da matéria seca, usando a incubadora DAISY^{II}, encontra-se no site da empresa (ANKOM, www.ankom.com). Este procedimento consiste na preparação das amostras e dos *filter bags*, da mistura da solução tampão e do inóculo ruminal para a incubação no aparelho. Este inóculo é injetado com CO₂ para manter as condições anaeróbicas da fermentação, tal como ocorre no rúmen do animal. Finalmente, faz-se a determinação de NDF das amostras removidas do fermentador para calcular a digestibilidade verdadeira da matéria seca.

Neste trabalho, a partir de cada um dos dois cortes de biomassa vegetal por parcela feitos no campo, preparam-se 4 amostras (réplicas) de 0,5 g cada para inserir nos *filter bags*. Usaram-se, portanto, 8 amostras para estimativa de digestibilidade (8 *filter bags*) por parcela de campo. Para a totalidade do delineamento experimental usaram-se um total de 408 *filter bags* (Figura 8).



Figura 8: Imagem dos 408 filter bags usados para o cálculo da digestibilidade.

A preparação dos *filter bags* e das amostras realizou-se da seguinte maneira. Primeiro, fez-se uma pré-lavagem dos *filter bags* (F57, ANKOM) em acetona durante 3 a 5 minutos para remover surfactantes que inibam a digestão microbiana, seguido de secagem em estufa a 65°C durante 48 horas. Posteriormente os *filter bags* foram numerados, registrando-se o peso (W1) de cada um (Figura 9). Foram depois colocados 0,5 g de amostra (W2) em cada um dos *filter bags* (Figura 10) que foram devidamente selados (Figura 11) e inseridos nos frascos de digestão do aparelho DAISY^{II}. Colocaram-se até 25 amostras por frasco (Figura 12). Foi ainda colocado um *filter bag* selado, sem amostra de biomassa vegetal, para calibração e cálculo de fator de correção (C1) (ANKOM, 2011). A incubação das amostras durou 48 h que é, normalmente, o tempo que dura a fermentação do alimento vegetal no rúmen do animal.



Figura 9: Exemplo de um filter bag já numerado. Neste caso trata-se da parcela 13, do corte 1 e da réplica D.

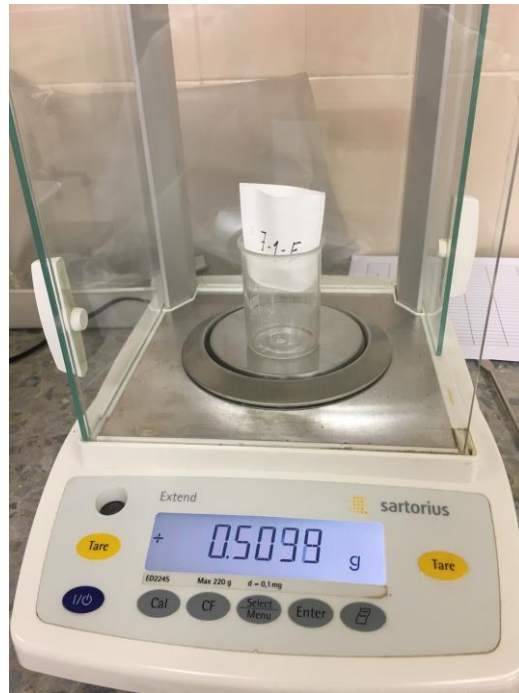


Figura 10: Pesagem de cerca 0,5 gramas de amostra em cada filter bag correspondente.



Figura 11: Processo de selagem de cada filter bag.



Figura 12: Exemplo de um dos frascos de digestão do aparelho Daisy^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY).

Neste trabalho, foram utilizados 2 equipamentos DAISY^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY), cada um com 4 frascos de digestão (Figura 13), tendo sido realizadas duas incubações de duas réplicas cada. Na primeira incubação as réplicas foram denominadas como A e B (uma por cada equipamento) e na segunda incubação as réplicas foram denominadas de C e D, tendo-se seguido os mesmos procedimentos em cada uma das incubações.



Figura 13: Equipamento Daisy^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY) utilizado para simular o processo de fermentação ruminal.

O meio de cultura para cada amostra de biomassa foi preparado 24 horas antes da incubação, tendo-se usado 7 litros de meio de cultura para cada 4 frascos de digestão (Tabela 2). Finalmente, uma vez preparado o meio de cultura, este foi injetado com CO₂ para colocar a solução em meio anaeróbico, simulando as condições de fermentação no rúmen animal (Figura 14).

Tabela 2: Preparo do meio de cultura.

	7L
Água (mL)	3160
Micro (mL)	8.4
Buffer (mL)	1665
Macro (mL)	1665
Resazurina (mL)	8.4
Redutora (mL)	500
Na ₂ S (g)	2.1
Cisteína-HCl (g)	2.1
NaOH (1N) (mL)	14



Figura 14: A: Meio de cultura já preparado; B: Fornecimento de CO₂.

O líquido ruminal foi obtido a partir do interior do rúmen de quatro ovelhas fistuladas de raça ASSAF (Figura 15), alimentadas com 800 g de feno e 200 g de concentrado por dia, administrado em duas porções iguais. O conteúdo ruminal de cada ovelha foi colhido, imediatamente antes da alimentação da manhã e filtrado através de gazes de náilon para garrafas térmicas armazenadas a 39°C. Em seguida, este material foi filtrado através de quatro camadas de gaze para frascos *erlenmeyer* com volume de 2 litros que foram mantidos em sala climatizada. Todo o processo de obtenção, transporte e filtragem do inóculo foi realizado em cerca de 20 a 30 minutos antes do início das incubações, tendo sido utilizados aproximadamente 2 litros de líquido ruminal por incubação. A manipulação dos animais foi feita em acordo com os protocolos do *Institutional Animal Care and Use* da Universidade de León, em Espanha.



Figura 15: Exemplo de uma das quatro ovelhas, fistuladas da raça ASSAF, utilizadas para obter o líquido ruminal; Situadas e tratadas pelo Instituto de Ganadería de Montaña, em León, Espanha.

Para realizar a incubação foram adicionados a cada frasco de digestão 1600 mL de meio de cultura e 400 mL de líquido ruminal (relação 1:4 inóculo e meio de cultura). Os frascos de digestão foram colocados um a um na incubadora DAISY^{II} (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY) durante 48 horas a uma temperatura constante de $39.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$.

Após 48 horas de incubação, os frascos com as amostras foram removidos e, uma vez drenado o fluido, os *filter bags* foram secos em estufa, a 65°C até estabilização do peso (Figura 16). Uma vez secos em estufa, os *filter bags* foram pesados, para se estimar a percentagem de matéria seca do material digerido e, de seguida, lavados no ANKOM 200 *Fiber Analyzer* com detergente neutro (Figura 16).



Figura 16: *Filter bags* depois da retirados dos frascos de digestão, prontos para o processo de secagem.



Figura 17: *Filter bags*, depois da secagem, lavados no ANKOM 200 *Fiber Analyzer* com detergente neutro.

A lavagem dos *filter bags*, no aparelho ANKOM 200 *Fiber Analyzer*, processou-se da seguinte maneira: foram colocados 24 *filter bags* em cerca de 2 litros de detergente (neste primeiro procedimento, com NDF) durante 75 minutos a uma temperatura de $100\pm 5^{\circ}\text{C}$. Uma vez decorrido aquele período, extraiu-se o detergente e fizeram-se três lavagens de 5 minutos com água destilada. Nas duas primeiras lavagens adicionaram-se ainda 4 mL de *alpha-amylase*. Após estas lavagens, os *filter bags* foram colocados em acetona aproximadamente durante 5 minutos (Figura 18), sendo depois secos em estufa a 60°C durante 48 horas.



Figura 18: Filter bags em acetona para acelerar o processo de secagem.

De acordo com o método de van Soest (1970), enquanto o conteúdo celular das amostras de plantas se solubiliza em detergente, a parede celular é insolúvel podendo apenas ser separada por filtragem. As frações resultantes da análise de digestibilidade são denominadas insolúveis em detergente neutro, como é o caso da fibra solúvel em detergente neutro (NDF) (também chamada de parede celular) que é essencialmente constituída, por celulose, hemicelulose, lignina, sílica e proteína lignificada.

Em ruminantes, uma dieta com altos teores de NDF afeta diretamente o consumo de matéria seca, pois níveis elevados de ingestão de fibra causam uma rápida sensação de “enchimento ruminal” com perdas de desempenho, pois o processo de saciedade pode ocorrer antes das necessidades energéticas do animal terem sido supridas.

Para determinar a “digestibilidade verdadeira” é necessário registrar o peso das amostras, já secas em estufa, após procedimento de NDF (W3), sendo que as amostras podem ser congeladas para posterior determinação de NDF (ANKOM, 2011).

A fórmula para calcular a digestibilidade verdadeira *in vitro* (TIVD) é a seguinte (ANKOM, 2011):

$$\%TIVD = \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100$$

Onde:

TIVD = digestibilidade verdadeira *in vitro* (%);

W1 = peso do *filter bag* (g);

W2 = peso da amostra (g);

W3 = peso final do *filter bag* (g) + resíduo depois da incubação e tratamento com detergente neutro (g);

C1 = correção do *filter bag* “em branco” (peso final seco em estufa / peso inicial).

3.3.2.2. Método sem líquido ruminal

As análises sem recurso a líquido ruminal foram realizadas segundo os métodos de van Soest et al. (1991) e Goering e van Soest (1970). Neste caso, foram também utilizados *filter bags* (F57, ANKOM) preparados de modo semelhante ao do procedimento com líquido ruminal descrito anteriormente. Neste caso, usaram-se 3 réplicas de biomassa por cada parcela de campo, o que correspondeu a um total de 153 *filter bags* (Figura 19).



Figura 19: Exemplo de identificação dos *filter bags* para este procedimento; neste caso, trata-se das réplicas da parcela 35 tanto no corte 1 como no corte 2.

Depois de numerados e pesados com e sem amostra, os *filter bags* foram lavados no ANKOM 200 *Fiber Analyzer* com detergente neutro para determinação do NDF e pesados depois de secos em estufa. De seguida, foram lavados com detergente ácido para determinação do ADF (fibra solúvel em detergente ácido).

A ADF é a porção menos digestível da parede celular das plantas forrageiras pelos microrganismos do rúmen, sendo constituída na sua quase totalidade por lignina e celulose lenhificada. Depois de secos, os *filter bags* foram novamente pesados. Por último, estas réplicas foram colocadas em contacto com uma solução de enxofre (Figura 20) para que a celulose contida na fração ADF fosse queimada restando assim, apenas lignina, ou seja, a parte das células vegetais que é insolúvel e completamente indigestível pelos ruminantes (Figura 21).



Figura 20: A: Solução de enxofre (H_2SO_4) no lado esquerdo da Figura; B: Filter bags em contacto com a solução de enxofre (H_2SO_4).



Figura 21: Exemplo de um filter bag após todos os processos, ou seja, o que ficou de lignina desta amostra.

Na nutrição animal, a importância da lignina relaciona-se com os efeitos negativos deste composto na digestibilidade. Estes efeitos podem ser devidos à presença da lignina “per se” ou devido à barreira física que a lignina oferece à digestão dos nutrientes no interior da célula (Silva, 1998).

4. Análise estatística

Para verificar o efeito da adição de nutrientes e do tipo de nutrientes adicionados na biomassa vegetal total, percentagem de grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras espécies), diversidade de espécies e indicadores de digestibilidade utilizaram-se Modelos Lineares Gerais (GLM), quando se verificaram os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias. Quando estes pressupostos não se verificaram realizaram-se testes não paramétricos *Kruskal-Wallis*. As variáveis dependentes foram testadas quanto à normalidade usando o teste de *Kolmogorov-Smirnov* com correção de significância de Lilliefors e homogeneidade de variâncias usando o teste *Levene* (Marôco 2018). Como fatores fixos consideraram-se a adição de nutrientes e o tipo de nutrientes adicionados, os blocos como fator causalizado e como variáveis dependentes a biomassa, número de espécies, índice de Shannon-Wiener, e os vários indicadores de digestibilidade decorrentes da aplicação dos dois métodos laboratoriais descritos, isto é: com líquido ruminal (Tilley e Terry, 1962) ou por análise de fibra sem líquido ruminal (van Soest, 1970).

Para valores significativos resultantes da análise GML, utilizaram-se testes *pos-hoc* Tukey para comparação múltipla de médias e no caso dos testes não paramétricos de *Kruskal-Wallis*, a comparação múltipla das médias das ordens (Marôco, 2018). Finalmente avaliou-se a significância estatística dos parâmetros nutritivos e características da pastagem com correlação *Spearman*. O nível de significância foi definido em $p=0,05$. A análise estatística foi realizada com o IBM SPSS Statistics v. 26 (IBM, Chicago, IL, EUA).

5. Resultados

5.1. Efeitos da fertilização na biomassa e composição específica da pastagem

A produção de biomassa aumentou significativamente ($F= 5.735$, $p = 0,034$) com o número de nutrientes adicionados. A biomassa foi mais elevada para o tratamento de adição de 3 nutrientes, sendo as diferenças significativas entre o controlo (0 nutrientes) e os tratamentos com 2 ($p = 0,051$) e 3 ($p = 0,036$) nutrientes (Figura 22). No caso do tratamento com dois

nutrientes a biomassa da pastagem foi significativamente superior para as combinações NP ($p = 0,041$) e PK ($p = 0,065$) mas não para a combinação de dois nutrientes NK, e também muito próximo da significância ($p = 0,057$) para a combinação NPK (Figura 23).

A biomassa tende, pois, a ser mais baixa quando se fertiliza apenas com um tipo de nutriente, quando comparadas com parcelas fertilizadas com NP, NPK e PK.

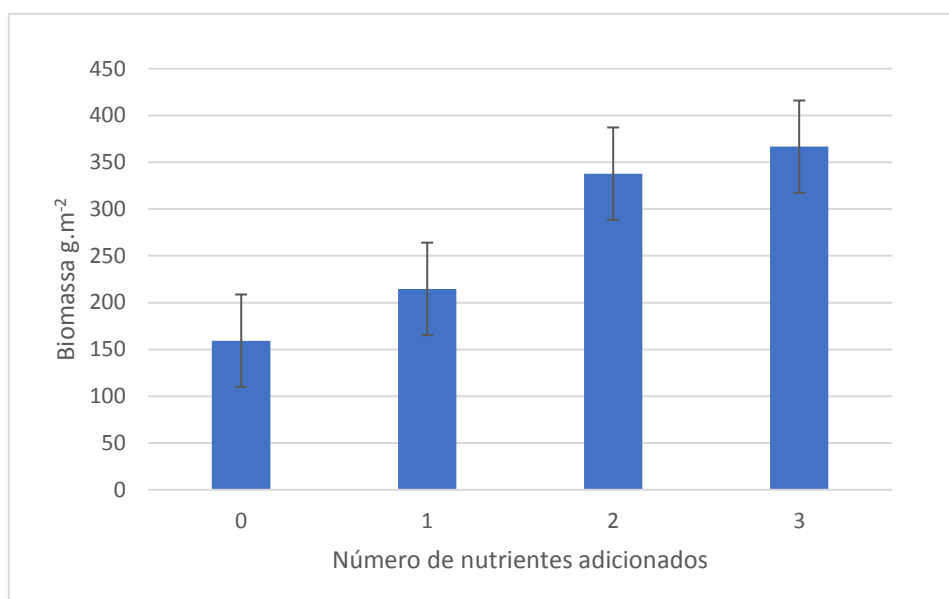


Figura 22: Resposta da biomassa (média±erro padrão) da pastagem (g.m⁻²) ao número de nutrientes adicionados.

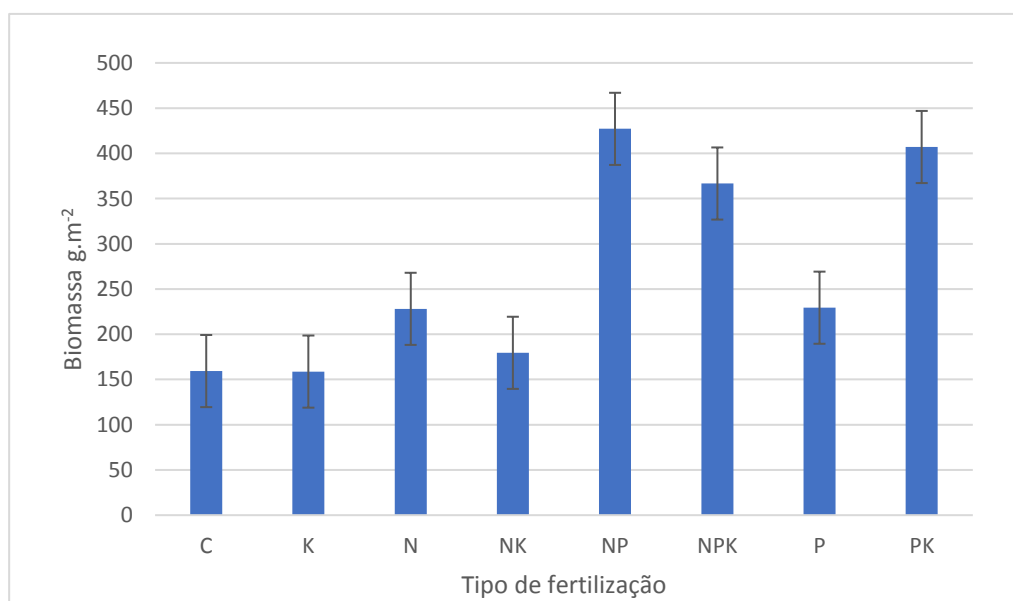


Figura 23: Gráfico de barras que relaciona a biomassa (g.m⁻²) (média±erro padrão) com o tipo de nutrientes adicionados.

Os tratamentos de fertilização afetaram também a percentagem de grupos funcionais na pastagem. O número de nutrientes adicionados teve um efeito estatisticamente significativo na percentagem de gramíneas das comunidades ($H(3) = 11,293$; $p = 0,010$; $n = 36$). De acordo com a comparação múltipla de médias das ordens, esta significância foi devida a diferenças entre tratamento com 1 ou 3 nutrientes ($p = 0,006$) enquanto o grupo “outras” foi significativamente menos abundante ($H(3) = 10,935$; $p = 0,012$; $n = 36$), provavelmente por serem dominadas pelas gramíneas, havendo diferenças significativas entre tratamento com um e três nutrientes ($p = 0,009$) (Figura 24). No caso das leguminosas, o efeito da fertilização aproximou-se da significância ($p = 0,068$) com tendência para maior abundância no tratamento com dois nutrientes (Figura 24).

Quando se avalia quais as combinações de nutrientes que mais contribuem para a abundância de grupos funcionais, verifica-se que as gramíneas respondem sobretudo ao tratamento NPK cujo nível se aproxima da significância ($H(7) = 13,255$; $p = 0,066$; $n = 36$) (Figura 25) enquanto o grupo “outras” responde positiva e significativamente ($H(7) = 14,228$; $p = 0,047$; $n = 36$) à fertilização azotada e negativamente à fertilização NPK ($p = 0,023$) (Figura 25). Já as leguminosas respondem positivamente ($H(7) = 25,100$; $p = 0,001$; $n = 36$) à fertilização com P, significativamente superior à fertilização com NPK ($p = 0,047$), e positivamente à fertilização com PK tendencialmente superior ($p = 0,058$) à fertilização com NPK sendo provavelmente a sua produção limitada pelos nutrientes P e K (Figura 25).

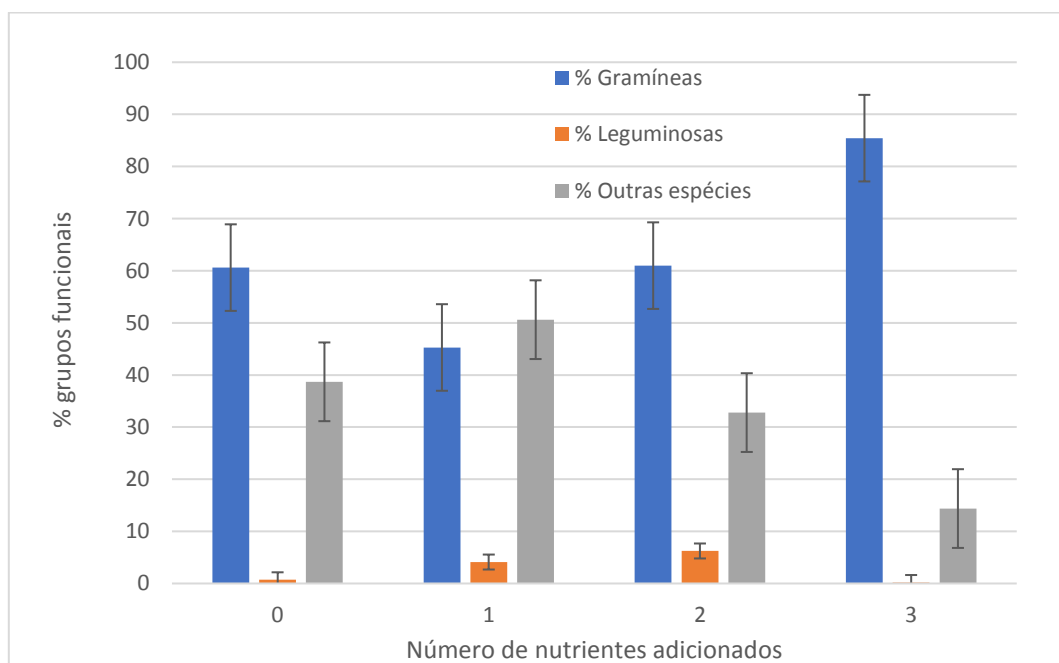


Figura 24: Gráfico de barras sobre a composição de espécies que relaciona a percentagem de grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras espécies) com o número de nutrientes adicionados.

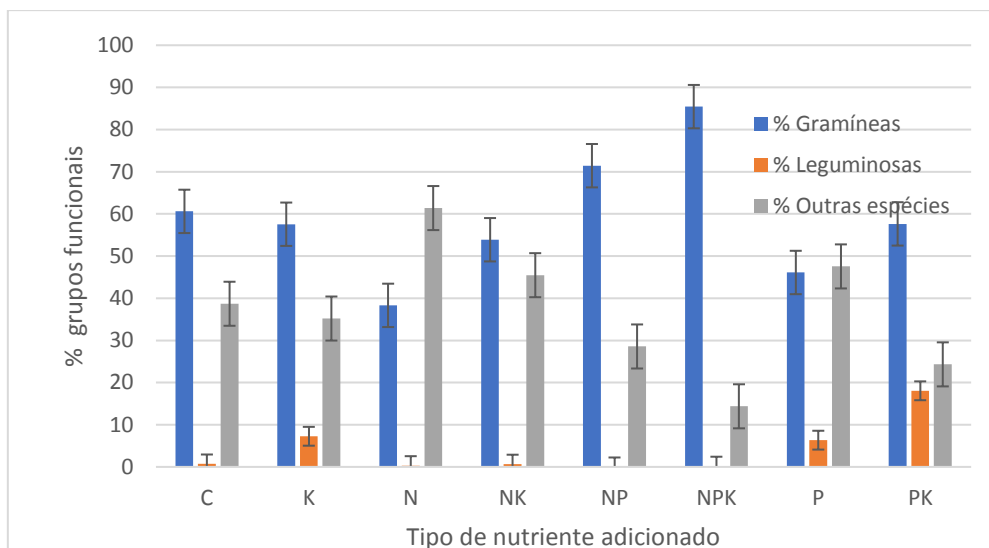


Figura 25: Gráfico de barras que relaciona a percentagem de grupos funcionais (gramíneas, leguminosas e outras espécies) com o/os tipo/os de fertilização utilizado/os.

A riqueza específica (isto é, o número total de espécies) da pastagem difere significativamente com a adição de nutrientes ($F = 13,391$; $p=0,005$), sem interação significativa entre número de nutrientes e bloco. O tratamento com um nutriente tem riqueza em espécies significativamente superior aos tratamentos com dois ($p=0,041$) e três nutrientes ($p<0,001$) (Figura 25). Por sua vez, o Controlo tem também maior número de espécies que os tratamentos com dois ($p=0,019$) e três nutrientes ($p<0,001$) (Figura 26).

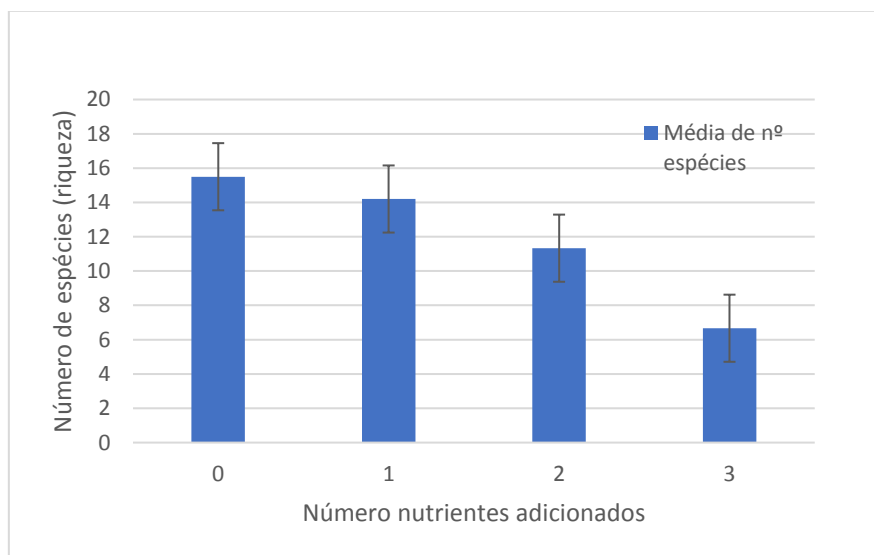


Figura 26: Gráfico de barras que relaciona o número de espécies (média \pm erro padrão) com o número de nutrientes adicionados.

Relativamente à combinação de nutrientes encontram-se também diferenças estatisticamente significativas com a riqueza específica ($H(7) = 19,527$; $p=0,007$; $n = 36$). O tratamento NPK tem significativamente menor número de espécies que o tratamento K ($p=0,024$) e Controlo ($p=0,027$) mas não difere significativamente dos outros tratamentos (Figura 27).

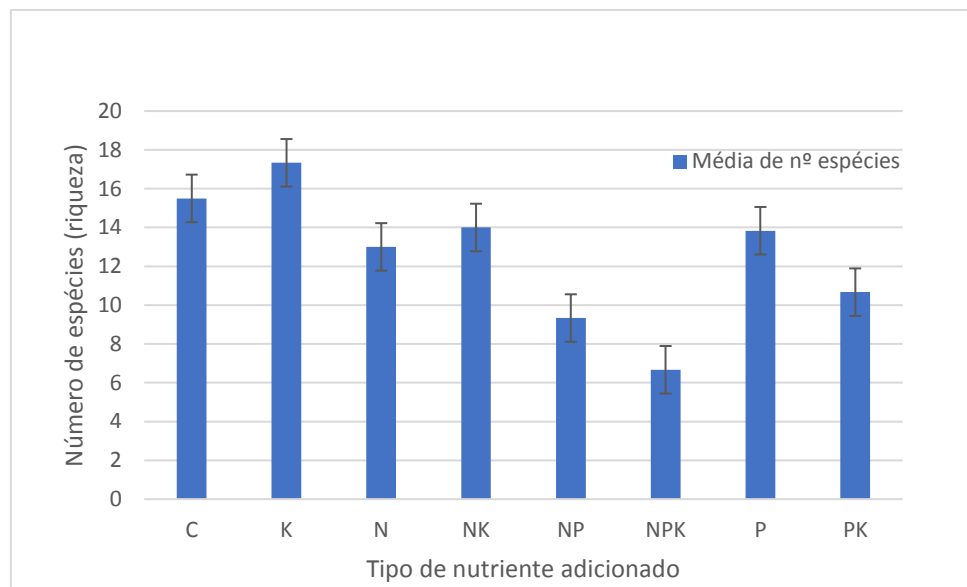


Figura 27: Gráfico de barras que relaciona a riqueza de espécies (média±erro padrão) consoante o/os nutriente/es adicionado/os.

Quando, além do número e espécies se considera também a sua abundância (índice de diversidade Shannon-Wiener (H)) verifica-se que a diversidade de espécies difere significativamente entre o número de nutrientes adicionados ($F=8,444$; $p=0,014$) sendo que esta diferença se deve ao tratamento com três nutrientes para o qual a diversidade é significativamente mais baixa do que no controlo ($p=0,001$), ou nos tratamentos com um ($p<0,001$) e dois ($p=0,004$) nutrientes (Figura 28).

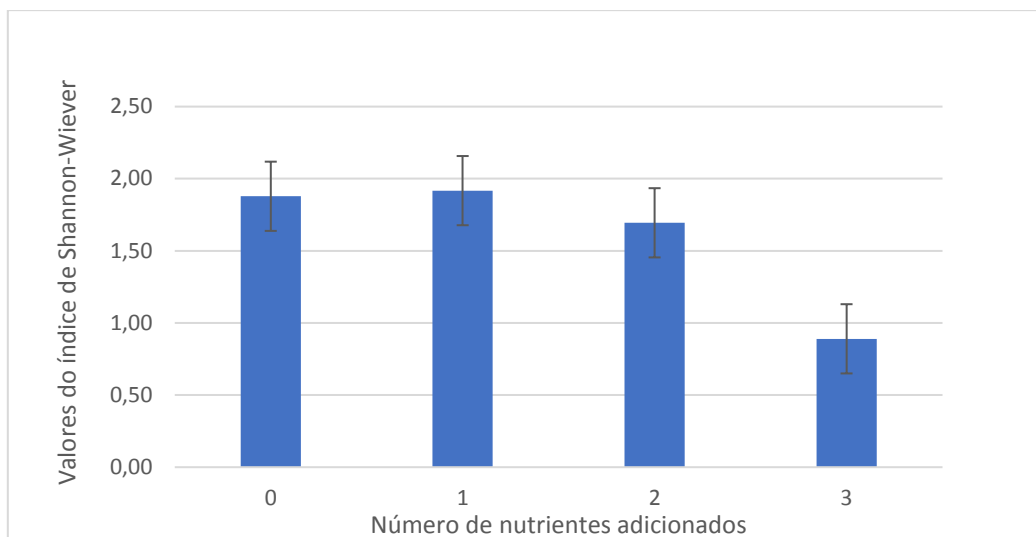


Figura 28: Gráfico de barras que representa o índice de Shannon-Wiener (média \pm erro padrão) de acordo com o número de nutrientes adicionados.

Relativamente ao tipo de nutrientes verificam-se também diferenças significativas com o H ($H(7) = 18,511$; $p=0,010$; $n = 36$). O tratamento com NPK tem uma diversidade significativamente mais baixa que os tratamentos com K ($p=0,039$) e NK ($p=0,039$) (Figura 29).

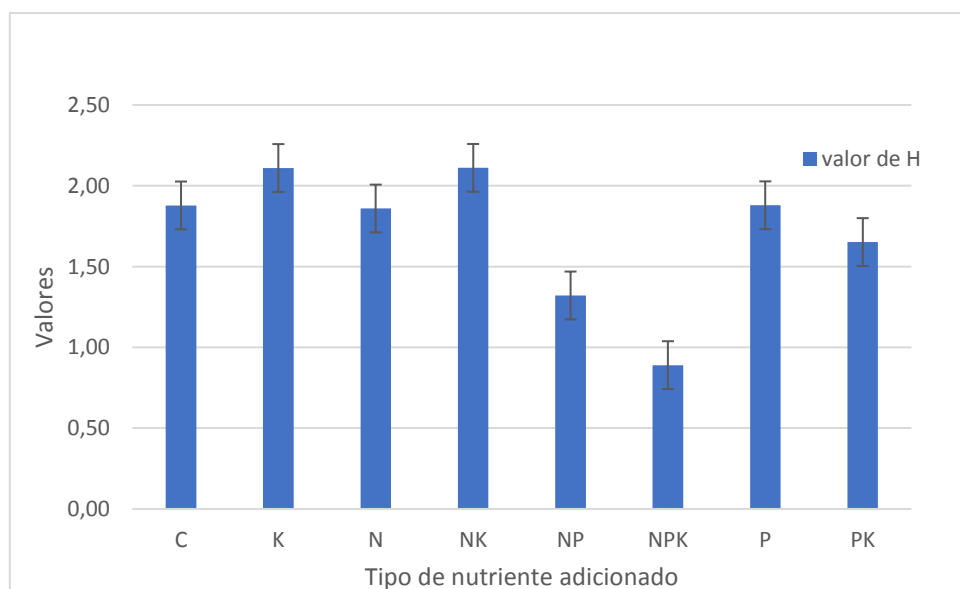


Figura 29: Gráfico de barras que representa o índice de Shannon-Wiener (média \pm erro padrão) de acordo com o tipo de nutrientes adicionados.

5.2. Relação da digestibilidade com as características da pastagem

A digestibilidade, quer avaliada pelo método de incubação em líquido ruminal (Tilley e Terry, 1962) quer pelo método de diluição da fibra (van Soest, 1970) não variou significativamente entre os tratamentos de adição de nutrientes (Tabela 3) nem com o tipo de nutrientes adicionados (Tabela 4).

Tabela 3. Resultados (média \pm erro padrão), em percentagem, dos indicadores de digestibilidade decorrentes da aplicação dos dois métodos laboratoriais: com líquido ruminal (Tilley e Terry, 1962) ou por análise de fibra sem líquido ruminal (van Soest, 1970) de acordo com o número de nutrientes adicionados

Número de nutrientes adicionados	TIDV	NDF	ADF	LIG
0	53,73 \pm 3,43	69,39 \pm 5,43	42,91 \pm 2,69	9,81 \pm 3,60
1	54,60 \pm 6,95	64,21 \pm 3,23	40,56 \pm 2,71	10,77 \pm 3,41
2	58,06 \pm 3,23	65,65 \pm 4,16	39,35 \pm 3,87	8,67 \pm 3,29
3	56,79 \pm 5,43	68,87 \pm 3,51	38,21 \pm 3,56	7,94 \pm 3,98

TIDV: Digestibilidade verdadeira *in vitro*; NDF: Fibra em detergente neutro; ADF: Fibra em detergente ácido; LIG: Lignina em detergente ácido.

Para o caso da digestibilidade *in vitro* os valores variaram entre 53,73 \pm 3,43 e 58,06 \pm 3,23, mas sem diferenças significativas entre tratamentos. O NDF variou entre 64,21 \pm 3,23 e 69,39 \pm 5,43 e o ADF entre 38,21 \pm 3,56 e 42,91 \pm 2,69, mas também sem diferenças significativas entre tratamentos ($p > 0,05$). Já no caso da lignina os valores variaram entre 7,94 \pm 3,98 e 10,77 \pm 3,41.

Tabela 4. Resultados (média \pm erro padrão), em percentagem, dos indicadores de digestibilidade decorrentes da aplicação dos dois métodos laboratoriais: com líquido ruminal (Tilley e Terry, 1962) ou por análise de fibra sem líquido ruminal (van Soest, 1970) de acordo com o tipo de nutrientes adicionados

Tipo de nutriente	TIDV	NDF	ADF	LIG
C	53,73 \pm 2,23	69,39 \pm 1,02	42,91 \pm 0,52	9,81 \pm 0,30
K	52,69 \pm 2,31	64,66 \pm 1,16	39,06 \pm 0,65	9,47 \pm 1,75
N	55,34 \pm 2,16	64,13 \pm 1,23	40,66 \pm 0,83	10,36 \pm 0,62
NK	58,19 \pm 5,56	63,90 \pm 0,66	38,50 \pm 0,38	8,05 \pm 0,12
NP	59,99 \pm 2,21	67,06 \pm 1,37	38,66 \pm 0,90	7,21 \pm 0,28
NPK	56,79 \pm 6,24	68,87 \pm 0,90	38,21 \pm 0,63	7,94 \pm 0,19
P	54,81 \pm 3,60	64,07 \pm 1,34	41,20 \pm 0,52	11,83 \pm 0,37
PK	56,00 \pm 3,53	66,00 \pm 0,57	40,89 \pm 0,42	10,74 \pm 0,33

TIDV: Digestibilidade verdadeira *in vitro*; NDF: Fibra em detergente neutro; ADF: Fibra em detergente ácido; LIG: Lignina em detergente ácido.

Encontrou-se uma correlação negativa significativa ($r = -0.425$, $p < 0.010$) entre ADF e o número de nutrientes adicionados (Figura 30). No entanto, nenhum dos outros indicadores de digestibilidade apresentou correlações significativas com o número de nutrientes adicionados.

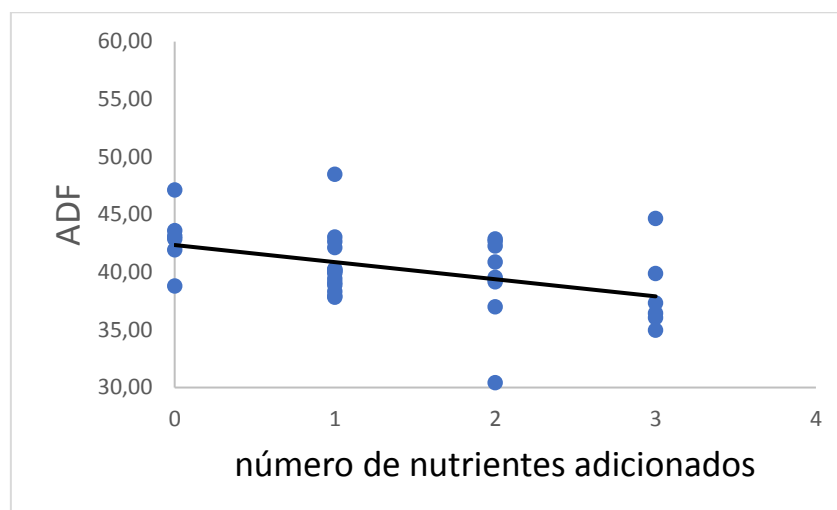


Figura 30: Correlações de Spearman entre ADF e o número de nutrientes.

Também se encontraram, no entanto, relações significativas entre vários parâmetros nutritivos avaliados e as características da pastagem.

No caso do NDF, (um indicador de ingestibilidade, variação inversa, da pastagem), este parâmetro não apresentou relação significativa com a biomassa da pastagem. No entanto o NDF correlacionou-se positiva e significativamente com a abundância de gramíneas ($r=0,608$, $p<0.001$), negativamente com a abundância de “outras” espécies ($r=-0,537$, $p=0,001$) e sem relação significativa com a abundância de leguminosas. Nem riqueza nem diversidade de espécies se correlacionaram significativamente com o NDF (Tabela 5).

Os valores de digestibilidade (TIDV), determinados pelo método adaptado de Tilley e Terry (1962), relacionou-se significativa e positivamente com a biomassa total da pastagem ($r=0,366$, $p=0,028$) e a abundância de gramíneas ($r=0.403$, $p=0,015$), tendo ainda tido relação negativa com a abundância de “outras” espécies na pastagem ($r=-0,350$, $p=0,037$) e não significativa com a abundância de leguminosas. Nem a riqueza ou diversidade de espécies afetaram os valores de TIVD (Tabela 5).

Relativamente ao ADF (um indicador de digestibilidade, variação inversa, da pastagem), relacionou-se negativa e significativamente com a biomassa da pastagem ($r = -0,383$, $p = 0,021$) e a abundância de gramíneas ($r = -0,381$, $p = 0,022$), e positivamente com a abundância de “outras” espécies ($r = 0,354$, $p = 0,034$) mas não evidenciou correlação com o teor de leguminosas. Quer o número ($r = 0,333$, $p = 0,047$), quer a diversidade ($r = 0,334$, $p = 0,047$) de espécies estiveram positiva e significativamente correlacionados com o ADF.

*Tabela 5. Valores dos coeficientes de correlação de Spearman entre os indicadores de digestibilidade e várias variáveis caracterizadoras da pastagem. Resultados significativos são indicados por * para $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$*

	TIDV	NDF	ADF	LIG
Biomassa	0,366*	n.s.	-0,383*	n.s.
% gramíneas	0,403*	0,608***	-0,381*	-0,737***
% outras espécies	-0,350*	-0,537***	0,034*	0,653***
% leguminosas	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Número de espécies	n.s.	n.s.	0,333*	n.s.
H	n.s.	n.s.	0,334*	n.s.

Em particular a lignina, um indicador inversamente relacionado com a digestibilidade da pastagem, evidenciou uma correlação significativamente negativa com o teor de gramíneas ($r = -0,737$, $p = < 0,001$) e positiva ($r = 0,653$, $p < 0,001$) com o teor de “outras espécies” na pastagem, mas não significativa com a abundância de leguminosas nem com biomassa total e diversidade de espécies. Ou seja, a diversidade e a riqueza em espécies parece não influenciar a digestibilidade nos ruminantes.

6. Discussão

O presente trabalho investiga os efeitos da fertilização, em contexto de alterações globais, na diversidade, produtividade e valor nutritivo para ruminantes de uma pastagem mediterrânica. O aumento generalizado de fertilizantes azotados e fosfatados e, ainda, o aumento de N reativo resultante da utilização de combustíveis fósseis tem vindo a aumentar a disponibilidade de nutrientes na atmosfera (Peñuelas *et al.*, 2013). Os trabalhos sobre os efeitos da fertilização na diversidade e funcionamento dos ecossistemas e, nomeadamente pastagens, tem vindo a aumentar (por exemplo, Nogueira *et al.*, 2018), mas são mais raras as abordagens que estabelecem uma ligação entre efeitos na diversidade e produtividade e valor nutritivo da pastagem para produção secundária. Este trabalho aborda este tema evidenciando algumas relações entre os fatores citados e com relevância para a gestão destes sistemas.

6.1. Efeitos da fertilização na biomassa e composição específica da pastagem

A fertilização com NPK, NP e PK aumentou claramente a produção de biomassa relativamente a parcelas controlo, sugerindo que a produção está a ser limitada sobretudo pela disponibilidade de P, comum a estes três tratamentos e, provavelmente sendo também a colimitação pelo K também importante. Sabe-se que em clima mediterrânico os solos são particularmente limitados na disponibilidade de N e P (Nogueira *et al.*, 2018).

Sabe-se também, que de modo geral, a deposição de N está a aumentar a taxas mais elevadas que a de P (Peñuelas *et al.*, 2012; 2013), pelo que alteração da razão N:P pode aumentar a importância do P como o fator limitante da produtividade primária (Fay *et al.*, 2015). Por outro lado, a resposta da pastagem à adição múltipla de nutrientes (tratamentos com três e dois nutrientes) mas não à adição de um só nutriente, sugere haver colimitação múltipla de nutrientes, como encontrado em outros trabalhos sobre fertilização de pastagens (Dukes *et al.*, 2005; Harpole *et al.*, 2016). Embora não investigado neste trabalho, a colimitação da disponibilidade de nutriente e de água também são fatores determinantes na produtividade das pastagens no mediterrâneo (Hooper e Johnson, 1999; Zavaleta *et al.*, 2003). De facto, a adição de N, por si só, não aumentou a produção da biomassa da pastagem, sugerindo que a colimitação por outros nutrientes, e eventualmente pela água, pode ser mais determinante (Nogueira *et al.*, 2018), ao contrário do tratamento NPK, com três nutrientes, que teve efeitos muito significativos na biomassa da pastagem. A colimitação da produtividade vegetal por nutrientes múltiplos foi observada em vários trabalhos em pastagens mediterrânicas, mas também em biomas áridos e semiáridos (Dukes *et al.*, 2005; Harpole *et al.*, 2016).

6.2. Fertilização e grupos funcionais

Embora o tratamento de fertilização com três nutrientes (NPK) tenha aumentado a biomassa da pastagem relativamente às parcelas controlo, o presente trabalho evidenciou também que este aumento se deve à contribuição de alguns grupos funcionais em particular, as gramíneas. A importância da contribuição das gramíneas para a biomassa total das pastagens naturais foi comprovada em trabalhos com dados de várias regiões do globo (DeMalach *et al.*, 2017a), incluindo este sítio de estudo, na Companhia das Lezírias (Nogueira *et al.* 2018). Mais ainda, a adição múltipla de nutrientes aumenta a proporção de gramíneas de forma desproporcional relativamente a outros grupos funcionais de plantas (Zavaleta *et al.*, 2003; Harpole *et al.*, 2016; DeMalach *et al.*, 2017a), tal como observado no presente trabalho. De facto, as gramíneas são um grupo particularmente competitivo quer ao nível das raízes (DiTommaso e Aarssen, 1989; Craine *et al.*, 2001) mas também da parte aérea (Ansquer *et al.*, 2009; Craine e Dybzinski, 2013) eliminando facilmente outros grupos de plantas das comunidades. Por outro lado, verificou-se também que a abundância de leguminosas não respondeu à adição múltipla de nutrientes e, inclusivamente, a adição de N gerou resposta negativa neste grupo funcional. Resultados semelhantes foram observados por outros autores (Suding *et al.*, 2005; van den Berge *et al.*, 2010).

6.3. Fertilização e diversidade

Em geral, a adição de nutrientes provocou uma diminuição da diversidade e riqueza de espécies, tal como observado também por Nogueira *et al.* (2018) no mesmo ensaio experimental em anos anteriores. Para este resultado pode contribuir a resposta desproporcional das gramíneas à fertilização. As gramíneas, mais competidoras, mais altas, crescem rapidamente limitando o acesso à luz a outras espécies, como as leguminosas e outras plantas que se localizam na base da pastagem, acabam por ser excluídas da comunidade, reduzindo-se a diversidade de espécies tal como sugerido por alguns autores (Tilman, 1987; DeMalach *et al.*, 2017b). De facto, Nogueira *et al.* (2018) demonstrou que a fertilização múltipla favorece espécies mais altas, como as gramíneas, em detrimento das leguminosas e outros grupos de plantas.

Efeitos da fertilização na diversidade de espécies ou abundância de determinados grupos funcionais pode afetar o funcionamento da pastagem (por exemplo: ciclo de nutrientes, utilização da água, decomposição da matéria orgânica) (Garnier, 2004; Hartpole *et al.* 2016) e, consequentemente, os serviços gerados por estes ecossistemas, nomeadamente, os serviços gerados para produção animal e efeitos no valor nutritivo da pastagem.

6.4. Os tratamentos de fertilização e o valor nutritivo da pastagem

Sendo que a fertilização afeta, como discutido acima, a produção de biomassa a abundância dos grupos funcionais, nomeadamente, gramíneas, e a diversidade da pastagem, é de esperar, também, efeitos na qualidade alimentar da pastagem. No presente trabalho avaliou-se o valor alimentar da pastagem para ruminantes, determinada por dois métodos independentes: um método baseado na digestibilidade *in vitro* e na abordagem desenvolvida por Tilley e Terry (1962), e um método baseado na separação faseada dos constituintes das células vegetais segundo a abordagem desenvolvida por Goering e van Soest (1970). Esta abordagem foi possível através do acordo com o Instituto de Ganadería de Montaña, CSIC - Universidade de León, em Espanha, no qual a autora desenvolveu o trabalho laboratorial referente ao valor nutritivo da pastagem.

6.5. Fertilização e digestibilidade

Embora a digestibilidade *in vitro* (TIDV) tenha sido mais alta no tratamento de fertilização com dois nutrientes e mais baixa nas parcelas controlo, isto é, na pastagem natural sem fertilização (Tabela 3), estas diferenças não foram significativas. Esta tendência, no entanto, merece ser investigada no futuro, com uma maior intensidade de amostragem. De facto, por razões logísticas, foram consideradas, por exemplo, 9 réplicas para o tratamento de fertilização com dois nutrientes, mas este número de réplicas decresce para 3, quando se considera a identidade dos nutrientes (Tabela 1). Seria, pois, importante, em trabalhos futuros sobre digestibilidade *in vitro* e fertilização confirmar a existência ou não desta tendência que sugere valores de digestibilidade mais elevados para tratamentos com 2 nutrientes.

No caso da abordagem Goering e van Soest (1970) encontrou-se uma relação significativa e negativa entre o valor de ADF e o número de nutrientes adicionados por tratamento de fertilização (Figura 29). A componente ADF das células vegetais, resultante do tratamento com detergente ácido, corresponde a componentes como celulose, lignina e sílica (van Soest, 1994). O ADF tem tendência a aumentar com o desenvolvimento fenológico das plantas (van Soest 1994; Hansey *et al.*, 2010). Normalmente, valores mais elevados de ADF correspondem também a valores mais baixos de digestibilidade (van Soest, 1994) o que sugere, neste caso, que a adição de três nutrientes poderá melhorar a qualidade da pastagem para ruminantes. Tal como para o caso da digestibilidade *in vitro*, esta relação pode servir de base para desenvolver investigação futura, nomeadamente saber quais as combinações de diferentes nutrientes que poderão afetar os valores de ADF.

6.6. Biomassa, composição florística e valor nutritivo da pastagem

Uma vez que os tratamentos de fertilização afetaram a biomassa e a composição florística da pastagem estudou-se qual a relação entre os diferentes parâmetros nutritivos avaliados e aquelas características da pastagem, tendo sido várias as relações significativas, tanto positivas como negativas (Tabela 5).

O valor de digestibilidade real (TIVD) relacionou-se de maneira positiva e significativa com a biomassa da pastagem e a abundância de gramíneas. Este resultado é expectável pois o grupo com maior contribuição relativa para a biomassa é o das gramíneas. As gramíneas por seu lado, são caracterizadas por parede celular com maiores teores relativo de celulose e mais baixos de lignina, relativamente a outros grupos de plantas como as leguminosas (Shipley, 2001). Pelo contrário, o grupo de outras espécies, que inclui plantas com maiores proporções de estrutura de suporte (por exemplo raminhos) e por isso mais ricos em lignina teve uma correlação fortemente negativa com o TIVD. Portanto, sendo a lignina uma componente não digerível, e um indicador inversamente relacionado com a digestibilidade da pastagem, este resultado seria, portanto, de esperar. Este resultado é aliás confirmado pela correlação fortemente negativa da lignina com o teor de gramíneas e positiva com o teor de “outras espécies”.

O componente NDF, associado aos teores de fibra bruta do alimento e normalmente um indicador de “saciedade” do ruminante (van Soest, 1994), evidenciou correlação fortemente positiva e significativa com a abundância de gramíneas e fortemente negativa com a abundância de “outras espécies”. Este resultado seria expectável dada a maior abundância de gramíneas, ricas em fibra bruta (valores mais elevados de NDF) que foi registadas nas várias parcelas amostradas. O ADF, associado à proporção de celulose, lignina e sílica na célula vegetal, apresentou relação fortemente negativa com a biomassa e o teor de gramíneas das parcelas amostradas. Este resultado reflete também, uma vez mais, as características estruturais do grupo dominante na pastagem, as gramíneas, com maiores teores proporcional de celulose ou sílica, comparativamente a outros grupos de plantas. Importante também referir, a ausência de relações significativas com o grupo das leguminosas, neste caso, por surgirem sempre com proporções de abundância muito baixa nos vários tratamentos como verificado no mesmo ensaio em anos anteriores (Nogueira *et al.* 2018).

7. Conclusões

O presente trabalho confirma estudos anteriores que sugerem que, no contexto das alterações globais, o aumento da eutrofização de vários ecossistemas incluindo as pastagens, pode alterar níveis de produção de biomassa e composição florística com potenciais efeitos em serviços do ecossistema, como, por exemplo no valor nutritivo da pastagem para ruminantes. Medições independentes do valor nutritivo, evidenciam também que a alteração da composição de espécies e da biomassa da pastagem afetam potencialmente o seu valor nutritivo. Estas medições, sugerem trabalho futuro sobre estas linhas de investigação, algumas já discutidas anteriormente, para que possamos compreender uma das consequências das alterações globais, a eutrofização, no valor nutritivo e potencial para produção secundária das pastagens.

8. Referências bibliográficas

- Alcade, C.R., Machado, R.M, Santos, G.T., Picolli, R., Jobim, C.C. 2001. Digestibilidade in vitro de alimentos com inóculos de líquido de rúmem ou de fezes de bovinos. *Acta Scientiarum* 23:917-921.
- Altangerel, B., Sengee, Z., Kramarova, D., Rop, O., Hoza, I. 2011. The determination of water soluble vitamins and in vitro digestibility of selected Czech cheeses. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 1225–1230.
- Anjos, A.N.A., Viegas, C.R., Gomes, R.S., Souza, J.C.C. 2020. Methods used to determination the constituents of the fibrous fraction, a review. *Archivos de zootecnia*, ISSN 0004-0592, 69: 246-256.
- ANKOM, Technology. Method 3: In vitro true digestibility using the DAISY^{II} Incubator. Disponível em: <http://www.ankom.com>. Acedido a 20.04.2020.
- ANKOM Technology. 2014. Neutral detergent fiber in feeds –filter bag technique (for A200 and A200I). Disponível em: <http://www.ankom.com>. Acedido a 20.04.2020.
- Ansquer, P., Al Haj Khaled, R., Cruz, P., Theau, J.P., Therond, O., Duru, M. 2009. Characterizing and predicting plant phenology in species-rich grasslands. *Grass and Forage Science* 64:57-70.
- Araújo, R.C. 2010. Óleos essenciais de plantas brasileiras como manipuladores da fermentação ruminal in vitro. Tese elaborada para obtenção do grau de doutoramento em Ciências. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Brasil.
- Armstrong, R.H., Common, T.G., Smith, H.K. 1986. The voluntary intake and *in vivo* digestibility of herbage harvested from indigenous hill plant communities. *Grass Forage Science* 41:53–60.
- Attwood, G.T., Reilly, K. 1995. Identification of proteolytic rumen bacteria isolated from New Zealand cattle. *Journal of Applied Bacteriology* 79:22-29.
- Báez, S., Fargione, J., Moore, D.I., Collins, S.L., Gosz, J.R. 2007. Atmospheric nitrogen deposition in the northern Chihuahuan desert: Temporal trends and potential consequences. *Journal of Arid Environments* 68:640–651.

- Baumgardt, B.R., Taylor, M.W., Cason, J.L. 1962. Evaluation of forages in the laboratory. II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimates of forage nutritive value. *Journal of Dairy Science* 45:62-68.
- Berchielli, T.T., Oliveira, S.G., Garcia, A.V. 2005. Application of techniques for intake, diet composition and digestibility studies. *Archives of Veterinary Science* 10:29-40.
- Bobbink, R., Hicks, K., Galloway, J., Spranger, T., Alkemade, R., Ashmore, M., Bustamante, M., Cinnerby, S., Davidson, E., Dentener, F., Emmett, B., Erisman, J.W., Fenn, M., Gilliam, F., Nordin, A., Pardo, L., De Vries, W. 2010. Global assessment of nitrogen deposition effects on terrestrial plant diversity: A synthesis. *Ecological Applications* 20:30–59.
- Bonanomi, G., Caporaso, S., Allegrezza, M. 2006. Short-term effects of nitrogen enrichment, litter removal and cutting on a Mediterranean grassland. *Acta Oecologica* 30:419–425.
- Bonanomi, G., Incerti, G., Allegrezza, M. 2013. Assessing the impact of land abandonment, nitrogen enrichment and fairy-ring fungi on plant diversity of Mediterranean grasslands. *Biodiversity and Conservation* 22:2285–2304.
- Bruinenberg, M.H., Valk, H., Korevaar, H., Struik, P.C. 2002. Factors affecting digestibility of temperate forages from seminatural grasslands: a review. *Grass and Forage Science* 57: 292-301.
- Bugalho, M.N., Abreu, J.M.F. 2008. The multifunctional role of grasslands. In: Porqueddu C. and M. M. Tavares de Sousa (Eds), *Sustainable Mediterranean grasslands and their multifunctions*. *Options Méditerranéennes* 79:25-30.
- Cadotte, M.W., Carscadden, K., Mirotchnick, N. 2011. Beyond species: Functional diversity and the maintenance of ecological processes and services. *Journal of Applied Ecology* 48:1079–1087.
- Caldeira, M.C., Hector, A., Loreau, M., Pereira, J.S. 2005. Species richness, temporal variability and resistance of biomass in a Mediterranean production grassland. *Oikos* 110:115–123.
- Carmona, C.P., Mason, N.W.H., Azcárate, F.M., Peco, B. 2015. Inter-annual fluctuations in rainfall shift the functional structure of Mediterranean grasslands across gradients of productivity and disturbance. *Journal of Vegetation Science* 26:538–551.

- Canfield, D.E., Glazer, A.N., Falkowski. 2010. The evolution and future of earth's nitrogen cycle. *Science* 330:192-196.
- Carnicer, J., Sardans, J., Stefanescu, C., Ubach, A., Bartrons, M., Asensio, D., Peñuelas, J. 2015. Global biodiversity, stoichiometry and ecosystem function responses to human-induced C–N–P imbalances. *Journal of Plant Physiology* 172, 82-91.
- Chapin III, F.S. 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11:233-260.
- Chapin III, F.S., Matson, P.A., Vitousek, P.M. 2011. *Principles of terrestrial ecosystem ecology*. Springer Science & Business Media. 2nd Edition. New York. USA.
- Chrenková, M., Čerešňáková, Z., Formelová, Z., Poláčíková, M., Mlyneková, Z., Flák, P. 2011. Chemical and nutritional characteristics of different types of DDGS for ruminants. *Journal of Animal and Feed Sciences* 21:425-435.
- Clark, C.M., Cleland, E.E., Collins, S.L., Fargione, J.E., Gough, L., Gross, K.L., Pennings, S.C., Suding, K.N., Grace, J.B. 2007. Environmental and plant community determinants of species loss following nitrogen enrichment. *Ecology Letters* 10:596–607.
- Cleland, E.E., Harpole, W.S. 2010. Nitrogen enrichment and plant communities. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1195:46–61.
- Cott, M.A. 1988. Amylolytic activity of selected species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 54:772-776.
- Craine, J.M., Dyzinski, R. 2013. Mechanisms of plant competition for nutrients, water and light. *Functional Ecology* 27:833-840.
- Craine, J.M., Froehle, J., Tilman, D.G., Wedin, D.A., Chapin III, F.S. 2001. The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* 2:274–285.
- Craine, J.M., Froehle, J., Tilman, D.G., Wedin, D.A., Chapin III, F.S. 2003. The relationships among root and leaf traits of 76 grassland species and relative abundance along fertility and disturbance gradients. *Oikos* 93:274-285.
- Daubenmire, R. 1959. A canopy-coverage method of vegetation analysis. *Northwest Science* 33: 43-64.

- Deak, A., Hall, M.H., Sanderson, M.A., Archibald, D.D. 2007. Production and nutritive value of grazed simple and complex forage mixtures. *Agronomy Journal* 99:814–821.
- DeMalach, N., Zaady, E., Kadmon, R. 2017a. Resource manipulations in natural vegetation: a review. *Global Ecology and Biogeography* 26:983-992.
- DeMalach, N., Zaady, E., Kadmon, R. 2017b. Light asymmetry explains the effect of nutrient enrichment on grassland diversity. *Ecology Letters* 20:60-69.
- Díaz, S., Cabido, M. 2001. Vive la différence: Plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends in Ecology and Evolution* 16:646–655.
- Díaz, S., Lavorel, S., De Bello, F., Quétier, F., Grigulis, K., Robson, T.M. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:20684–20689.
- Díaz-Villa, M. D., Marañón, T., Arroyo, J., Garrido, B. 2003. Soil seed bank and floristic diversity in a forest-grassland mosaic in southern Spain. *Journal of Vegetation Science* 14:701–709.
- DiTommaso, A., Aarssen, L.W. 1989. Resource manipulations in natural vegetation: a review. *Vegetatio* 84:9-29.
- Dukes, J.S., Chiariello, N.R., Cleland, E.E., Moore, L.A., Shaw, M.R., Thayer, S., Tobeck, T., Mooney, H.A., Field, C.B. 2005. Responses of grassland production to single and multiple global environmental changes. *PLoS Biology* 3(10):e319.
- Duru M., Cruz P., Raouda A.H.K., Ducourtieux C., Theau J.P. Relevance of plant functional types based on leaf dry matter content for assessing digestibility of native grass species and species-rich grassland communities in spring. *Agronomy Journal* 100:1622–1630.
- El Fiel, H.E.A., El Tinay, A.H., Elsheikh, E.A.E. 2002, Effect of nutritional status of faba bean (*Vicia faba* L.) on protein solubility profiles. *Science Direct* 76:219-223.
- Espigares, T., Peco, B. 1993. Mediterranean pasture dynamics: the role of germination. *Journal of Vegetation Science* 4:189–194.
- Espigares, T., Peco, B. 1995. Mediterranean annual pasture dynamics: impact of autumn drought. *Journal of Ecology* 83:135–142.

- Fay, P.A., Carlisle, J.D., Knapp, A.K., Blair, J.M., Collins, S.L. 2000. Altering rainfall timing and quantity in a mesic grassland ecosystem: Design and performance of rainfall manipulation shelters. *Ecosystems* 3:308–319.
- Fay, P.A., Prober, S.M., Harpole, W.S., Knops, J.M.H., Bakker, J.D., Borer, E.T., Lind, E.M., MacDougall, A.S., Seabloom, E.W., Wragg, P.D., Adler, P.B., Blumenthal, D.M., Buckley, Y.M., Chu, C., Cleland, E.E., Collins, S.L., Davies, K.F., Du, G., Feng, X., Firn, J., Gruner, D.S., Hagenah, N., Hautier, Y., Heckman, R.W., Jin, V.L., Kirkman, Klein, J., Ladwig, L.M., Li, Q., McCulley, R.L., Melbourne, B.A., Mitchell, C.E., Moore, J.L., Morgan, J.W., Risch, A.C., Schütz, M., Stevens, C.J., Wedin, D.A., Yang, L.H. 2015. Grassland productivity limited by multiple nutrients. *Nature Plants* 1:15080.
- Fisher, J.B., Badgley, G., Blyth, E. 2012. Global nutrient limitation in terrestrial vegetation. *Global Biogeochem Cycles* 26:GB3007.
- Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J.W., Steitzinger, S.P., Howarth, R.W., Cowling, W.B., Cosby, B.J. 2003. The nitrogen cascade. *BioScience* 53:341-356.
- Galloway, J.N., Dentener, F.J., Capone, D.G., Boyer, E.W., Howarth, R.W., Seitzinger, S.P., Asner, G.P., Cleveland, C.C., Green, P.A., Holland, E.A., Karl, D.M., Michaels, A.F., Porter, J.H., Townsend, A.R., Vöosmarty, C.J. 2004. Nitrogen Cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry* 70:153–226.
- García-Martínez, A., López-González, F., Prospero-Bernal, F., Albarrán-Portillo, B., Arriaga-Jordán, C.M. 2020. Evaluation of urea treated maize straw (*Zea mays* L.) as a feeding strategy for dairy cows in small-scale dairy systems. *Agroproductividad* 13:11-17.
- Garnier, E., Cortez, J., Billès, G., Navas, M., Roumet, C., Debussche, M., Laurent, G., Blanchard, A., Aubry, D., Beilmann, A., Neill, C., Toussaint, J. 2004. Plant functional markers capture ecosystem properties during secondary succession. *Ecological Society of America* 84:2630-2637.
- Genç, B., Salman, M., Bolukbas, B., Kaya, I., Açıci, M. 2020. The effects of fumaric and malic acids on the in vitro true digestibility of some alternative feedstuffs for ruminants. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 67:185-192.
- Giorgi, F. 2006. Climate change hot-spots. *Geophysical Research Letters* 33:1–4.
- Goering, H.K., van Soest, P.J. 1970. *Forage fiber analyses, apparatus, reagents, procedures and some applications*. Agricultural handbook, 379. Washington, DC.

- Hansey, C.N., Lorenz, A.J., de Leon, N. 2010. Cell wall composition and ruminant digestibility of various maize tissues across development. *Bioenerg. Res.* 3:28-37.
- Harpole, W.S., Potts, D.L., Suding, K.N. 2007. Ecosystem responses to water and nitrogen amendment in a California grassland. *Global Change Biology* 13:2341–2348.
- Harpole, W.S., Tilman, D. 2007. Grassland species loss resulting from reduced niche dimension. *Nature* 446:791–793.
- Harpole, W.S., Sullivan, L.L., Lind, E.M., Firn, J., Adler, P.B., Borer, E.T., Chase, J., Fay, P.A., Hautier, Y., Hillebrand, H., MacDougall, A.S., Seabloom, E.W., Williams, R., Bakker, J.D., Cadotte, M.W., Chaneton, E.J., Chu, C., Cleland, E.E., D'Antonio, C., Davies, K.F., Gruner, D.S., Hagenah, N., Kirkman, K.P., Knops, J.M.H., La Pierre, K.J., McCulley, R.L., Moore, J.L., Morgan, J.W., Prober, S.W., Risch, A.C., Schuetz, M., Stevens, C.J., Wragg, P.D. 2016. Addition of multiple limiting resources reduces grassland diversity. *Nature* 537:93–96.
- Hautier, Y., Niklaus, P.A., Hector, A. 2009. Competition for light causes plant biodiversity loss after eutrophication, *Science* 324:636-638.
- Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M.C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P.G., Finn, J.A., Freitas, H., Giller, P.S., Good, J., Harris, R., Högberg, P., HussDanell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Körner, C., Leadley, P.W., Loreau, M., Minns, A., Mulder, C.P.H., O'Donovan, G., Otway, S.J., Pereira, J.S., Prinz, A., Read, D.J., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.D., Siamantziouras, A.S.D., Spehn, E.M., Terry, A.C., Troumbis, A.Y., Woodward, F.I., Yachi, S., Lawton, J.H. 1999. Plant diversity and productivity experiments in european grasslands. *Science* 286:1123–1127.
- Hector, A., Bagchi, R. 2007. Biodiversity and ecosystem multifunctionality. *Nature* 448:188–90.
- Hoekstra, J.M., Boucher, T.M., Ricketts, T.H., Roberts, C. 2005. Confronting a biome crisis: global disparities of habitat loss and protection. *Ecology Letters* 8:23-29.
- Hooper, D.U., Johnson, L.C. 1999. Nitrogen limitation in dryland ecosystems: Responses to geographical and temporal variation in precipitation. *Biogeochemistry* 46:247-293.
- Hunt, C.W., Paterson, J.A., Williams, J.E., 1985. Intake and digestibility of alfalfa-tall fescue combination diets fed to lambs. *Journal Animal Science* 60:301–306.

- Holden, L.A. 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *Journal of Dairy Science* 82:1791-1794.
- Holt, C., Muir, D.D., Sweetsur, A.W.M. 1978. Seasonal changes in the heat stability of milk from creamery silos in south-west Scotland. *Journal of Dairy Research* 45:183-190.
- Huyghe C, Baumont R, Isselstein J. 2008. Plant diversity in grasslands and feed quality. *Grassland Science European* 13:375–386.
- INMG. 1991. O clima de Portugal. Normais climatológicas da região Ribatejo e Oeste correspondentes a 1951-1980.
- IUSS Working Group WRB. 2006. World reference base for soil resources 2006. World Soil Resources Reports 103. FAO, Rome. ISBN 92-5-105511-4
- Jouany, J. 1996. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *The Journal of Nutrition* 126:1335-1346.
- Köppen, W. 1990. *Geographische Zeitschrift*, JSTOR.
- Lavorel, S., Garnier, E. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16:545-556.
- Lázaro, R., Rodrigo, F.S., Gutiérrez, L., Domingo, F., Puigdefábregas, J. 2001. Analysis of a 30-year rainfall record (1967–1997) in semi-arid SE Spain for implications on vegetation. *Journal of Arid Environments* 48:373–395.
- LeBauer, D.S., Treseder, K.K. 2008. Nitrogen limitation of net primary productivity in terrestrial ecosystems is globally distributed. *Ecology* 89:371-379.
- López, S. 2005. In vitro and in situ techniques for estimating digestibility. In: Dijkstra, J., Forbes, J.M., France, J. (Ed.). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. 2 ed. Cambridge: CABI Publishing 87-121.
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.F., Rees, R.M., Peyraud, J.L. 2014. Potential of legume-based grassland–livestock systems in Europe: a review. *Grass and Forage Science* 69:206-228.
- Mabjeesh, S.J., Cohen, M., Ariell, A. 2000. In vitro methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. *Journal of Dairy Science* 83:2289-2294.
- Mahowald, N., Jickells, T.D., Baker, A.R., Artaxo, P.A., Benitez-Nelson, C.R., Bergametti, G., Bond, T.C., Chen, Y., Cohen, D.D., Herut, B., Kubilay, N., Losno, R., Luo, C., Maenhaut, W., McGee, K.A., Okin, G.S., Siefert, R.L., Tsukuda, S. 2008. Global distribution of

atmospheric phosphorus sources, concentrations and deposition rates, and anthropogenic impacts. *Global Biogeochemical Cycles* 22:GB003240.

Marôco, J. 2018. *Análise Estatística com o SPSS Statistics*. 7ª edição. ReportNumber. Lisboa. Portugal.

McAllister, T.A., Phillippe, R.C., Rode, L.M., Cheng, K.J. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science* 71:205-212.

McCarrick, R.B., Wilson, R.K. 1966. Effects of nitrogen fertilization of mixed swards on herbage yield, dry matter digestibility and voluntary food intake of the conserved herbages. *Grass and Forage Science* 21:195-199.

Menke, H.H., Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28:7-55.

Meter Operating Manual LP-80. 2018. Decagon Devices. Pullman. EUA.

Miranda, J.D., Padilla, F.M., Pugnaire. F.I. 2009. Response of a Mediterranean semiarid community to changing patterns of water supply. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11:255–266.

Mott, G.O. 1970. Evaluacion de la produccion de forrajes In: Hughes, H.D., Heath, M.E., Metcalfe, D.S. (Eds.) *Forrajes - la ciencia de la agricultura basada en la producción de pastos*. México. p.131-141.

Mouillot, D., Villéger, S., Scherer-Lorenzen, M., Mason, N.W.H. 2011. Functional structure of biological communities predicts ecosystem multifunctionality. *PLoS One* 6:e17476.

Nocek, J.E. 1985. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *Journal of Animal Science* 60:1347-1358.

Nogueira, C., Bugalho, M.N., Pereira, J.S., Caldeira, M.C. 2017. Extended autumn drought, but not nitrogen deposition, affects the diversity and productivity of a mediterranean grassland. *Science* 138:99-108.

Nogueira, C., Nunes, A., Bugalho, M.N., Branquinho, C., McCulley, R.L., Caldeira, M.C. 2018. Nutrient addition and drought interact to change the structure and decrease the functional diversity of a mediterranean grassland. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6:155.

Nogueira, C. 2018. Responses and mechanisms of a Mediterranean grassland ecosystem to nutrient addition. Tese elaborada para obtenção do grau de doutor em engenharia florestal e dos recursos naturais. Instituto Superior de Agronomia – Universidade de Lisboa. Lisboa.

Nutrient Network home page: <http://www.nutnet.org/home>; acedido a 10.05.2020.

Ochoa-Hueso, R., Allen, E.B., Branquinho, C., Cruz, C., Dias, T., Fenn, M.E., Manrique, E., Pérez-Corona, M.E., Sheppard, L.J., Stock, W.D. 2011. Nitrogen deposition effects on Mediterranean-type ecosystems: An ecological assessment. *Environmental Pollution* 159:2265–2279.

Ochoa-Hueso, R., Maestre, F.T., De Los Ríos, A., Valea, S., Theobald, M.R., Vivanco, M.G., Manrique, E., Bowker, M.A. 2013. Nitrogen deposition alters nitrogen cycling and reduces soil carbon content in low-productivity semiarid Mediterranean ecosystems. *Environmental Pollution* 179:185–193.

Orskov, E.R., McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science* 92:499-503.

Peco, B., Espigares, T., Levassor, C. 1998. Trends and fluctuations in species abundance and richness in Mediterranean annual pastures. *Applied Vegetation Science* 1:21–28.

Peñuelas, J., Filella, I. 2001. Phenology: Responses to a warming world. *Science* 294:793-795.

Peñuelas, J., Sardans, J., Rivas-Ubach, A., Janssens, I.A. 2012. The human-induced imbalance between C, N and P in Earth's life system. *Global Change Biology* 18:3–6.

Peñuelas, J., Poulter, B., Sardans, J., Van Der Velde, P.C.M., Bopp, L., Boucher, O., Godderis, Y., Hinsinger, P., Llusia, J., Nardin, E., Vicca, S., Obersteiner, M., Janssens, I.A. 2013. Human-induced nitrogen–phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. *Nature Communications* 4.

Pérez-Camacho, L., Rebollo, S., Hernández-Santana, V., Gracia-Salgado, G., Pavón-García, J., Gómez-Sal, A. 2012. Plant functional trait responses to interannual rainfall variability, summer drought and seasonal grazing in Mediterranean herbaceous communities. *British Ecological Society* 26:740-749.

- Pitt, M.D., Heady, H.F. 1978. Responses of annual vegetation to temperature and rainfall patterns in northern California. *Ecology* 59:336–350.
- Phoenix, G.K., Emmett, B.A., Britton, A.J., Caporn, S.J.M., Dise, N.B., Helliwell, R., Jones, L., Leake, J.R., Leith, I.D., Sheppard, L.J., Sowerby, A., Pilkington, M.G., Rowe, E.C., Ashmore, M.R., Power, S.A. 2012. Impacts of atmospheric nitrogen deposition: responses of multiple plant and soil parameters across contrasting ecosystems in long-term field experiments. *Global Change Biology* 18:1197-1215.
- Phoenix, G.K., Hicks, W.K., Cinderby, S., Kuylensstierna, J.C.I., Stock, W.D., Dentener, F.J., Giller, K.E., Austin, A.T., Lefroy, R.D.B., Gimeno, B.S., Ashmore, M.R., Ineson, P. 2006. Atmospheric nitrogen deposition in world biodiversity hotspots: The need for a greater global perspective in assessing N deposition impacts. *Global Change Biology* 12:470–476.
- Reid, R.L., Jung, C.A., Murray, S.J. 1966. Nitrogen fertilization in relation to the palatability and nutritive value of orchardgrass. *Journal of Animal Science* 25:636-645.
- Reid, R.L., Templeton, W.C.J., Ranney, T.S., Thayne, W.V. 1987. Digestibility, intake and mineral utilization of combinations of grasses and legumes by lambs. *Journal of Animal Science* 64:1725–1734.
- Rockstrom, J., Steffen, W., Noone, K., Persson, A., Chapin III, F.S., Lambin, E.F., Lenton, T.M., Scheffer, M., Folke, C., Schellnhuber, H.J., Nykvist, B., De Wit, C.A., Hughes, T.,
- Rook, A.J., Yarrow, N.H., 2002. Incorporating grazing behaviour measurements in models to predict herbage intake by grazing dairy cows. *Grass Forage Science* 57:19–24.
- Rota, C., Manzano, P., Carmona, C.P., Malo, J.E., Peco, B. 2017. Plant community assembly in Mediterranean grasslands: understanding the interplay between grazing and spatiotemporal water availability. *Journal of Vegetation Science* 28:149–159.
- Ruiz, R.P., Díaz, R.R., Hernández, F.G., Aryal, D.R., Venegas, J.A., Romero, L.A., Castillo, A.C. 2019. Bromatological analyses and ruminal fermentation in vitro of excreta of animal origin for use in the feeding of ruminantes. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 22:107-113.
- Royal Society. 2009. https://royalsociety.org/~media/Royal_Society_Content/policy/publications/2009/4294967719.pdf. Acedido a 05/12/2019.

- Sanderson, M.A. 2010. Stability of production and plant species diversity in managed grasslands: a retrospective study. *Basic and Applied Ecology* 11:216–224.
- Senger, C.C.D., Mühlbach, P.R.F., Sanchez, L.M.B., Kozloski, G.V., Kist, G.P., Lima, L.D., Netto, D.P. 2007. Comparação entre os métodos químicos, *in situ* e *in vivo* para estimativa do valor nutritivo de silagens de milho. *Ciência Rural* 37:835-840.
- Shipley, L.A. 2001. Grazers and Browsers: How digestive morphology affects diet selection. *Idaho Forest, Wildlife and Range Exp. Sta. Bull* 70:20-27.
- Silva, A.C., Santos, T.A.R., Silva, M.V.G., Oliveira, M.V.G., Moreira, D.R.M., Leite, A.C.L., Pereira, V.R.A. 2017. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *Amazonensis* L. *Experimental Parasitology* 177:57-65.
- Silva, D.J. 1998. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: Ed. UFV, p.166.
- Silva D.J., Queiroz, A.C. 2002. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ª Edição. Viçosa: UFV, p.235.
- Smith, M.D., Knapp, A.K., Collins, S.L. 2009. A framework for assessing ecosystem dynamics in response to chronic resource alterations induced by global change. *Ecology* 90:3279–3289.
- Suding, K.N., Collins, S.L., Gough, L., Clark, C., Cleland, E.E., Gross, K.L., Milchunas, D.G., Pennings, S. 2005. Functional- and abundance-based mechanisms explain diversity loss due to N fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:4387–4392.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two stages technique for the “*in vitro*” digestion of forage crops. *Journal of British Grassland Society* 18:104-111.
- Tilman, D. 1987. Secondary succession and the pattern of plant dominance along experimental nitrogen gradients. *Ecological Monographs* 57:189–214
- Tilman, D. 1996. Biodiversity: Population Versus Ecosystem Stability. *Ecological Society of America* 77:350-363.
- Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., Siemann, E. 1997. The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* 277:1300–1302.

- Tilman, D., Isbell, F., Cowles, J.M. 2014. Biodiversity and Ecosystem Functioning: Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 45:471–493
- UNESCO. 1973. International classification and mapping of vegetation, Series 6, Ecology and Conservation. United Nations, Paris, France.
- van den Berge, J., Naudts, K., Zavalloni, C., Janssens, I.A., Ceulemans, R., Nijs, I. 2010. Altered response to nitrogen supply of mixed grassland communities in a future climate: A controlled environment microcosm study. Biogeosciences Discussions 7:3759–3604.
- van Ser Leeuw, S., Rodhe, H., Sörlin, S., Snyder, P.K., Costanza, R., Falkenmark, U.S.M., Karlberg, L., Corell, R.W., Fabry, F.J., Hansen, J., Walker, B., Liverman, D., Richardson, K., Crutzen, P., Foley, J.A. 2009. A safe operating space for humanity. Nature 461:472-475.
- van Soest, P.J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. Journal of the Association of Official Agricultural Chemists 46:825–835.
- van Soest, P.J. 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. Journal Animal Science 26:119–128.
- van Soest, P.P. 1994. Nutritional ecology of the ruminants. 2^a edition. Cornell University Press. Ithaca. NY. p.476.
- van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science 74:3583-3597.
- Vitousek, P., Howarth, R. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? Biogeochemistry 13:87-115.
- Wallace, R.J. 1996. Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. The Journal of Nutrition 126:1326-1334.
- Wiemer, P.J. 1993. Effects of dilution rate and pH on the ruminal cellulolytic bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 in cellulose-fed continuous culture. Archives of Microbiology 160:288-294.
- Westoby, M., Falster, D.S., Moles, A.T., Vesk, P.A., Wright, I.J. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. Annual Review of Ecology and Systematics 33:125–159.

- White, R., Murray, S., Rohweder, M. 2000. *Grassland ecosystems*. Page Pilot Analysis of Global Ecosystems. World Resource Institute, Washington, DC.
- Woodward, R.A., Harper, K.T., Tiedemann, A.R. 1984. An ecological consideration of the significance of cation-exchange capacity of roots of some Utah range plants. *Plant and Soil* 79:169-180.
- Xia, N., Wang, J.M., Gong, Q., Yang, X.Q., Yin, S.W., Qi, J.R. 2012. Characterization and in vitro digestibility of rice protein prepared by enzyme-assisted microfluidization: comparison to alkaline extraction. *Journal of Cereal Science* 56,482–489.
- Zavaleta, E.S., Shaw, M.R., Chiariello, N.R., Thomas, B.D., Cleland, E.E., Field, C.B., Mooney, H.A. 2003. Grassland responses to three years of elevated temperature, CO², precipitation, and N deposition. *Ecological Monographs* 73:585–604.